MIHAI BERCA

TEORIE ŞI PRACTICĂ ÎN BIOTEHNOLOGII GENETICE

EDITURA CERES

Scanned with OKEN Scanner

Prof. univ. dr. MIHAI BERCA

Teorie şi practică în biotehnologii genetice

EDITURA CERES
Bucureşti, 2005

Scanned with OKEN Scanner

Descrierea CIP a Bibliotecii Naţionale a României

BERCA, MIHAI

Teorie şi practică în biotehnologii genetice /
Mihai Berca. - Bucureşti : Ceres, 2005
Bibliogr.
ISBN 973-40-0710-6

575

Redactare: Aurora Dumitru, Claudia Popa
Tehnoredactare şi copertă: Carmen Biriş

ISBN: 973-40-0710-6

Format: 16/70×100. Coli de tipar: 31
Bun de tipar: 25.06.2005

Tiparul executat la Imprimeria „Oltenia" – Craiova
Str. Dr. Nicolae Ionescu Siseşti, nr. 21
Comanda: 75

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Partea I - Elemente teoretice de biologie celulară şi moleculară 11
Introducere 12
1. Noţiuni primare - definiţii 14
1.1. Celula 14
1.1.1. Nucleul conţine informaţiile genetice ale celulei 17
1.1.2. Sinteza proteinelor în ribozomi 19
1.1.3. Pe scurt despre reticulii endoplasmatici 20
1.1.4. Aparatul Golgi - importanţă, funcţii 22
1.1.5. Lizozomii - importanţă şi funcţii 24
1.1.6. Vacuolele - importanţă şi funcţii 27
1.1.7. Peroxizomii - alcătuire, funcţiuni 29
1.1.8. Mitocondriile şi cloroplastele - constituţie, funcţii 30
1.1.9. Citoscheletul 32
1.1.10. Microtubulii 34
1.1.11. Membrana celulelor la plante 36
1.1.12. Matrixul extracelular la animale 38
1.2. Înmulţirea celulelor. Genomul 45
1.2.1. Diviziunea la procariote 47
1.2.2. Eucariotele au un genom format din mai mulţi cromozomi 48
1.2.3. Ciclul celular. Mitoza alternează cu diferite faze intermediare 51
1.2.4. Rolul fusului celular 52
1.2.5. Aspecte ale împărţirii citoplasmei în citokineză 53
1.2.6. Semnalele externe celulelor coordonează diviziunea celulară 58
1.2.7. Reglementarea biochimică a ciclului celular 60
1.2.8. Prin cercetare, proteinele care reglementează ciclul celulei au putut fi identificate şi izolate 63
1.2.9. Celulele canceroase nu sunt supuse controlului ciclului celular 67

2. Genele 69
2.1. Meioza şi ciclurile dezvoltării sexuate 69
2.1.1. Urmaşii primesc genele părinţilor şi moştenesc cromozomii 69
2.1.2. Compoziţia moleculară a genelor 70
2.1.3. Replicarea ADN-ului 75
2.1.4. Enzimele şi alte proteine conduc procesul de replicare a ADN-ului 76
2.1.5. Cum începe sinteza ADN 78
2.1.6. Alte proteine implicate în procesul de replicare al ADN 79
2.1.7. Corecţia şi repararea daunelor în ADN-ul replicat 81

Scanned with OKEN Scanner

2.2. Diferența între înmulțirea asexuată și sexuată 82
2.3. Probleme ale înmulțirii sexuate – ciclul de dezvoltare sexuată 85
2.3.1. Ciclul de dezvoltare la oameni 85
2.3.2. Diversitatea în dezvoltarea ciclurilor sexuate 86
2.4. Înjumătățirea numărului de cromozomi în meioză și trecerea de la diploid la haploid 88
2.4.1. Comparația mitozei cu meioza 90
2.4.2. Comparații meioză - mitoză 92
2.5. Dezvoltarea ciclului sexuat și variabilitatea genetică a descendenților 92
2.5.1. Recombinarea liberă a cromozomilor 94
2.5.2. Recombinarea prin crossing-over 95
2.5.3. Fecundarea întâmplătoare 96
2.6. Noțiunea de genă îi aparține lui Mendel 96
2.6.1. Mendel și evaluarea cantitativă în genetică 97
2.6.2. Legea separării caracterelor 99
2.6.3. Încrucișare recisivă (Ruckkreuzung) 104
2.6.4. Legea sau regula independenței sau nedependenței 105
2.6.5. Genele mutante 106
2.7. Relația dintre gene și proteine 117
2.7.1. Transcripția și translația 119
2.7.2. Codul genetic al aminoacizilor 121
2.7.3. Decodificarea genetică 123
2.7.4. Limbajul informației genetice este comun 125
2.7.5. Sinteza ARN-ului 126
2.7.6. Inițierea transcripției 128
2.7.7. Alungirea coloanei ARN și finalizarea transcripției 129
2.7.8. Câteva detalii privind translația 130
2.7.9. Structura și funcția tARN-ului 130
2.7.10. Controlul enzimatic al translației 134
2.7.11. Revenim la ribozom 134
2.7.12. Sinteza unui polipeptid 137
2.7.13. De la polipeptid spre o proteină cu însușiri funcționale 141
2.7.14. Gena mozaic și purificarea ARN-ului 143
2.8. Mutațiile genelor pot să modifice funcțiile unor proteine 147
2.8.1. Tipuri de mutații genetice 150
2.8.2. Mutante 152

Scanned with OKEN Scanner

3. Despre genetica virusurilor şi a bacteriilor 155
3.1. Introducere 155
3.2. Descoperirea virusurilor 156
3.3. Construcţia virusurilor 158
3.3.1. Capside şi învelişuri 158
3.4. Unele însuşiri importante ale virusurilor 161
3.4.1. Virusurile nu se pot înmulţi decât în celule gazdă 161
3.4.2. Etapele unei infecţii virale 161
3.4.3. Modele de cicluri de înmulţire a virusurilor 162
3.5. Virusuri ARN 168
3.5.1. Dinamica apariţiei virusurilor 172
3.5.2. Un virus consacrat se poate extinde de la un organism gazdă la altul, aparţinând la specii diferite 173
3.5.3. Un virus consacrat se poate extinde rapid pornind de la populaţii reduse 174
3.6. Relaţii între virusuri şi cancer 174
3.7. Virusurile în plante şi efecte asupra producţiilor agricole 175
3.8. Alte modele de virusuri, viroide şi prione, mai simplu construite decât virusurile consacrate 177
3.8.1. O altă ipoteză privind dezvoltarea virusurilor 178
3.9. Bacteriile, modele de evoluţie corelată cu condiţiile de mediu 180
3.9.1. Apariţia unor noi suşe bacteriene 182
3.10. Controlul modului de exprimare al genelor la bacterii şi relaţiile cu mediul 197
3.10.1. Perceptele exprimării schimbului de substanţe 197
3.10.2 Unele principii de operare ale operonului 200
3.10.3. Activitatea regulatorie a genelor poate să fie negativă sau pozitivă ... 202

4. Exprimarea genelor la eucariote. Modele de organizare a genomului 207
4.1. Particularităţi ale genomului la eucariote 207
4.2. Organizarea structurală a cromatinei controlează exprimarea genelor 208
4.2.1.Nucleosomii sunt numiţi „perle" ale şnurului ADN 209
4.2.2. Procesul de ambalare – împachetare a ADN-ului – model de entropie redusă (adică ordine superioară) 211
4.3. Materialul genetic inert din genomul eucariotelor nu codifică duplicarea genelor 212
4.3.1. Secvenţe repetitive 213
4.4. Controlul manifestării genelor pe drumul dintre genă şi proteina funcţională 216

Scanned with OKEN Scanner

4.4.1. Organizarea genelor tipice la eucariote 216
4.4.2. Controlul transcripţiei 218
4.4.3. Procesarea şi exportul ARN-ului 220
4.4.4. Reglementarea degradării mARN-ului 220
4.4.5. Rolul hormonilor şi al altor substanţe chimice în influenţarea controlului exercitat de gene 221
4.4.6. Hormonii steroizi la vertebrate 223
4.4.7. Modificări ale exprimării genelor datorită unor modificări chimice şi ale reaşezării unor segmente de ADN în genom 225
4.5. Cancerul şi exprimarea genelor 232

5. Bioinformatică 238
5.1. Abordarea problemei 238
5.2. Utilizarea secvenţelor din băncile de secvenţe ADN poate ajuta la prognosticarea funcţiilor genelor nou descoperite 238
5.2.1. Un exemplu din zona medicinei ne poate edifica asupra acestei probleme 239

6. Genomul şi biologia organismelor 241
6.1. Abordarea problemei 241
6.2. Lărgirea informaţiei genetice prin prelucrarea datelor oferite de proteinele asemănătoare 244
6.3. Localizarea intracelulară a proteinelor şi a secreţiilor lor 246

Partea a II-a - Dezvoltări practice ale tehnologiilor biomoleculare 249
1. Tehnologiile genetice 250
1.1. Introducere 250
1.2. Etape în biotehnologiile genetice 251
1.3. Clonarea genelor pentru utilizare în cercetare şi industrie 251
1.4. Mijloacele de operare în tehnologia genetică 254
1.5. Vectorii ADN-ului 257
1.6. Organismele gazdă 259
1.7. Transferul genelor unei specii în genomul altei specii (posibilităţi tehnice) .. 259
1.7.1. Clonarea genelor de către bacterii şi plasmide 259
1.7.2. Obţinerea genelor necesare clonării 262
1.7.3. Introducerea ADN-ului în celule 265
1.7.4. Identificarea prin selecţie a genei de interes 266
1.7.5. Exprimarea genei clonate 267

2. Noi posibilităţi pentru tehnologiile genetice 270
2.1. Electroforeză - gel 270
2.2. Metode privind secvenţionarea ADN 270

Scanned with OKEN Scanner

2.3. Amplificarea, înmulţirea ADN-ului de interes, util 271
2.4. Hibrizi genetici sau hibridizare 272
2.5. Analiza Riflips sau RFLP 273
2.6. Alte progrese obţinute în biologie ca urmare a descoperirii tehnicilor biomoleculare 278

3. Genomul uman - obiectul de studiu al unui mare proiect 281
3.1. Tehnologia genetică în medicină şi industria farmaceutică 283
3.2. Posibilităţi de terapie genetică la oameni 285
3.3. Date recente privind îmbunătăţirea tehnicilor reproductive 292
3.4. Posibilităţi de tratare a bolilor Parkinson şi Chorea Huntington 293
3.5. ARN-ul interferent şi combaterea unor boli infecţioase 294
3.5.1. Utilizarea bacteriofagilor 294
3.5.2. Teoretic se poate combate şi SIDA 296
3.5.3. În curând viruşii vor înlocui antibioticele 298
3.6. Obţinerea de produse farmaceutice biotehnologice pentru numeroase alte boli. 302
3.6.1. Medicamente de mare interes 302
3.6.2. Puncte de vedere evolutive privind controlul virusului HIV 304
3.6.3. Un punct de vedere asupra combaterii prin tehnologii genetice a E.S.B. (Encefalita Spongiformă Bovină) 309
3.6.4. Vaccinurile şi alte modele de tratamente genterapeutice specifice cancerului 311
3.6.5. Alte gene terapeutice – avantaje şi riscuri 316
3.6.6. Genele în ajutorul retinei 318
3.7. Utilizarea tehnicilor genetice în medicina legală 320
3.8. Genele şi inteligenţa umană 322
3.9. Relaţii dintre mediu şi tehnologiile genetice 325
3.9.1. Energia viitorului aparţine bacteriilor modificate genetic 326
3.9.2. Pe scurt despre alte utilizări industriale ale biotehnologiilor genetice 338

4. Tehnologiile genetice în agricultură 339
4.1. Utilizarea tehnicilor genetice în fermele de animale 339
4.2 Obţinerea animalelor transgenice 340
4.3 Utilizarea tehnologiilor genetice la plante 341
4.3.1. Metode fizice şi biologice recunoscute şi utilate în transferul genelor la plante 347
4.4. Metode pentru evitarea rezistenţei şi mărirea spectrului de acţiune 352
4.5. A doua generaţie de organisme modificate genetic pentru controlul insectelor dăunătoar 355
4.5.1. Avantajul noilor OMG (Bt) 357
4.5.2. Markeri în afara circuitului 358
4.6. Inducerea rezistenţei genetice la virusurile plantelor 361

Scanned with OKEN Scanner

4.6.1. Metoda genei membranei proteice a virusului 362
4.6.2. Metoda antisense-secvenţe virale gene 362
4.7. Inducerea rezistenţei genetice la erbicide 365
4.8. Inducerea genetică a unor noi parametri calitativi ai plantelor de cultură ... 368
4.9. Diversificarea coloritului florilor prin tehnologii genetice 370
4.10. Inducerea rezistenţei plantelor la stres şi întârzierea îmbătrânirii lor 371
4.10.1. Îmbunătăţirea calităţii fructelor 373
4.11. Câteva elemente privind genomul plantelor 376
4.11.1. Proiectul *ARABIDOPSIS* *377*

5. Transformarea genetică a animalelor în scopul măririi producţiei şi calităţii ei 381
5.1. Obţinerea bovinelor transgenice 381
5.2. Organisme modificate genetic la oi, capre şi porci 383
5.3. Celule de origine sau de bază – clonarea mamiferelor, obţinerea lui Dolly 385
5.4. Obţinerea transgenică a păsărilor utile 390
5.4.1. Pentru ce avem nevoie de păsări transgenice? 391
5.5. Obţinerea peştilor transgenici 393
5.5.1. Pentru ce este necesară transgenitatea? 393
5.6. Câteva concluzii 394

6. Tehnicile genetice în ajutorul valorificării superioare a resurselor naturale 395
6.1. Fixarea azotului liber de către unele bacterii din sol 395
6.1.1. Fixarea liberă a azotului 396
6.1.2. Ce pot face biotehnologiile în acest domeniu 397
6.1.3. Fixarea simbiotică a azotului 398

7. Reguli şi legi privind utilizarea biotehnologiilor genetice 405
7.1. Introducere 405
7.2. Istoria se repetă 406

8. Alergătura după clonare şi după clone 409
8.1. Clonarea la oameni 409
8.1.2. Puţină istorie 410
8.1.3. Noi evoluţii spre clonarea reproductivă 413
8.1.4. Încet, dar sigur spre clonarea reproductivă a speciei umane 415
8.1.5. Pro şi contra clonării umane 418
8.1.6. Implicaţii etice, filozofice, morale 420
8.1.7. Chestiuni politice şi religioase - marea dilemă 421
8.1.8. Sunt necesare reguli şi legi 422

Scanned with OKEN Scanner

9. Siguranța produselor agricole, furajere și a alimentelor 425
9.1. Problema chimozinei 427
9.2. Cazul triptofan 427
9.3. O nouă problemă - somatropina bovină 428
9.4. Experimentarea în câmp a OMG-urilor 430
9.4.1. Povestea lui *Pseudomonas syringae* (bacteria anti-îngheț) 431
9.5. Reglementări privind terapia genetică la oameni 434
9.6. Pe scurt despre viitorul terapiei genetice 436

10. Relația dintre știință și religie la începutul secolului XXI 437
10.1. Puțină istorie 437
10.2. Ce se întâmplă cu Dumnezeu, cu credința noastră în El, cu religia 441
10.3. Genetică în loc de geneză? Dumnezeu intră în faliment? 442
10.4. Despre spirit, conștiință și eul individului 445

Glosar 450
Bibliografie selectivă 470

Anexe
Anexa 1. Grupările funcționale ale legăturilor organice 474
Anexa 2. Privire de ansamblu asupra funcțiilor proteinelor 475
Anexa 3. Aminoacizii proteinelor 476
Anexa 4. Frecvența prezenței celor 20 de aminoacizi în structura secundară a proteinelor 477
Anexa 5. Structura primară a unei proteine 478
Anexa 6. Structura secundară a unei proteine 479
Anexa 7. Privire de ansamblu asupra nivelurilor structurale ale proteinelor 480
Anexa 8. Unele variații codon – anticodon. Ipoteza Wobble 481
Anexa 9. Recunoașterca tARN-ului real prin controlul în 3 triple ale sintetazei 482
Anexa 10. Schema unei gene mozaic care exprimă formarea albuminei la ou 483
Anexa 11. Schema procesării din ADN a rARN-ului 484
Anexa 12. Cele mai importante tipuri de viruși care apar la vertebrate 485
Anexa 13. Viruși fotografiați la microscop electronic 486
Anexa 14. Utilizarea comercială a unor aminoacizi și enzime 487
Anexa 15. Gelelectroforeză pentru macromolecule 488
Anexa 16. Secționarea ADN-ului după metoda Sanger 489
Anexa 17. Reacția în lanț a polimerazei (PCR – Polimerase Chain Reaction) 491
Anexa 18. Hibridizarea acizilor nucleici și absorbția prin metoda Southern-Blotting 493
Anexa 19. Tehnica Mutageneză *invitro* 495
Anexa 20. Mutageneză coordonată de oligonucleotide cu ajutorul ADN-ului M13 496

Scanned with OKEN Scanner

Partea I

ELEMENTE TEORETICE DE BIOLOGIE CELULARĂ ŞI MOLECULARĂ

Scanned with OKEN Scanner

INTRODUCERE

Biologia de astăzi nu mai este deloc acelaşi lucru cu biologia de acum 50 sau 100 de ani. Deşi nu am reuşit să inventariem decât circa 1% din vieţuitoarele micro şi macro ale pământului, pe multe nu le mai putem studia, pentru că au dispărut înainte de a ajunge noi la ele.

Din aceste motive nici natura nu mai este aceeaşi ca acum 50 sau 100 de ani. Nu mai are aceeaşi forţă a menţinerii echilibrelor vieţii. Sunt necesare cât mai multe intervenţii antropice în repararea diferitelor forme de viaţă pe planetă. Cele mai multe reparaţii sunt necesare însuşi omului, specie lider în gestiunea biosferei. Reparaţiile biologice se fac prin biotehnologii, iar pentru a face o treabă de calitate avem nevoie să cunoaştem cât mai bine biologia moleculară, o altă ştiinţă faţă de cea a biologiei vieţuitoarelor mari, care se reducea, în principal, la morfologia şi fiziologia lor. Astăzi, practic, biologia moleculară, biochimia şi bioinformaţiile sunt discipline integrate, fără de care nu se pot imagina tehnicile genetice.

În 1995, cercetătorii unei firme biotehnologice au putut găsi în proteinele unei bacterii modificate genetic o anumită genă care reglează normalizarea metabolismului la şoareci. În fotografia de mai jos se observă, în vasul din stânga, un şoarece gras, predispus la obezitate, ale cărui funcţii vitale sunt reduse. Şoarecele dormitează tot timpul, este inactiv, nu are „poftă de viaţă". În partea dreaptă a fotografiei se observă, dimpotrivă, un şoarece frumos, bine închegat fizic şi foarte activ. Bacteria modificată genetic deţine o genă care regularizează greutatea animalelor cărora le este injectată, aceasta jucând rolul de transportor al genei în genomul animalelor.

Sute de milioane de oameni se luptă astăzi cu supraponderabilitatea şi cu bolile cauzate de aceasta - boli de inimă, de circulaţie, boli nervoase, de metabolism etc. Teoretic, problema este rezolvată din 1995. Practic se implementează în medicina umană în aceşti ani ai începutului secolului XXI.

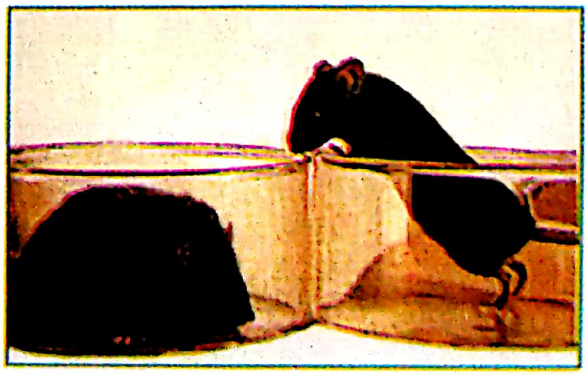


Fig. 1 – Normalizarea prin tehnologii genetice a greutăţii corpului la şoareci (*după Campbell A.Neil, 1997, Biologia, pag. 401*)

Astăzi sunt fabricate sute de produse utile, obţinute prin asemenea tehnici. Manipulările genetice efectuate în scopul unor aplicaţii practice cu mare efect economic au căpătat denumirea de **„Tehnologii Genetice", „Tehnică Genetică"** sau **„Inginerie Genetică".**

Scanned with OKEN Scanner

În ultimii ani a devenit o **adevărată rutină** ca genele aparținând unor organisme diferite, adeseori foarte îndepărtate ca specii, să fie combinate unele cu altele în **„vase de reacție”**, iar ADN-urile recombinate să fie introduse în celule vii unde acestea se multiplică și apoi „se exprimă”. Bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) este cel mai adesea utilizată ca organism gazdă, deoarece aceasta se poate cultiva ușor, iar biochimia sa este foarte bine cunoscută, ceea ce ajută enorm în reușita cercetărilor și a aplicațiilor lor practice. Tehnologia genetică face parte din grupul mult mai mare al biotehnologiilor și a contribuit enorm la revoluționarea acestora.

DEFINIȚIE

Biotehnologia ar putea fi deci definită ca **„o modificare a organismelor vii, sau a unor părți din acestea, în scopul obținerii și controlării unor procedee care să conducă la fabricarea unor produse speciale”.**

Numeroase procedee biotehnologice sunt cunoscute de mai multe secole. Exemplele clasice sunt oferite de:

- utilizarea microorganismelor pentru fabricarea vinului, a brânzei, iaurturilor etc.;
- metodele utilizate în ameliorarea clasică a plantelor și animalelor pot fi, de asemenea, considerate procedee biotehnologice.

Alte procedee ar mai fi:

- fabricarea antibioticelor cu ajutorul unor microorganisme (ciuperci în special);
- sinteza anticorpilor monoclonali prin tehnici imunologice moderne.

Biotehnologie înseamnă, de asemenea, modificarea ADN-ului *in vitro* - adică în afara organismului viu - așa cum s-a spus mai sus. Acest procedeu se deosebește de cele vechi prin aceea că este mult mai rapid și oferă numeroase posibilități de a schimba gene între organisme extrem de diferite, precum bacterii, plante și animale.

Deși tehnologia genetică este cunoscută îndeosebi pentru manipularea organismelor și fabricarea comercială a unor produse, marea ei importanță rezidă din progresul enorm făcut de cercetările de bază în domeniul biologiei moleculare care a adus practicii, procedee tehnologice extrem de valoroase.

Astăzi, biologia moleculară dispune de un *instrumentarium* cu mult mai valoros și activ, chiar și comparativ cu visurile cele mai optimiste de acum 10 ani. Aceste tehnici noi, revoluționare, au influențat recent toate domeniile biologiei.

În cele ce urmează vom prezenta cele mai utilizate metode și procedee în tehnica genetică, bineînțeles atât cât ne-a pus la dispoziție literatura de specialitate. Veți observa cât de mult au făcut și revoluționat în ultimul timp cercetările de bază asupra biotehnologiilor moleculare în domeniul medicinii, al criminalisticii, al agriculturii și altor domenii importante economice. În final ne vom permite să discutăm problemele sociale și etice provocate de revoluția științifică și economică declanșată de posibilitățile oferite lumii prin manipularea genelor. ■

Scanned with OKEN Scanner

1. NOȚIUNI PRIMARE - DEFINIȚII

Este de acum cunoscut că toate eucariotele de la o bacterie alcătuită dintr-o singură celulă și până la mamifere și om ale căror organisme sunt alcătuite din foarte multe miliarde de celule, au aceleași funcții vitale: metabolismul (hrănire - schimb de substanțe), respirația, transpirația și reproducția.

Cercetările au demonstrat, de asemenea, că celulele oricărui organism îndeplinesc fiecare în parte funcțiile acestuia și în același timp dețin întreaga informație genetică necesară refacerii organismului în întregime. Așa cum se va vedea, acest lucru se va realiza prin diferite feluri de clonare. Rezultă deci că celula, în orice formă s-ar afla, în orice organ și organism, joacă rolul de bază în „refacere" și că biologia ei stă la baza tuturor tehnicilor biologice. ■

1.1. CELULA

Pornind de la ideea că cititorul nostru cunoaște foarte multe detalii despre celule, prezentăm, în esență, două celule (fig. 2 și 3), una aparținând regnului animal, alta regnului vegetal:

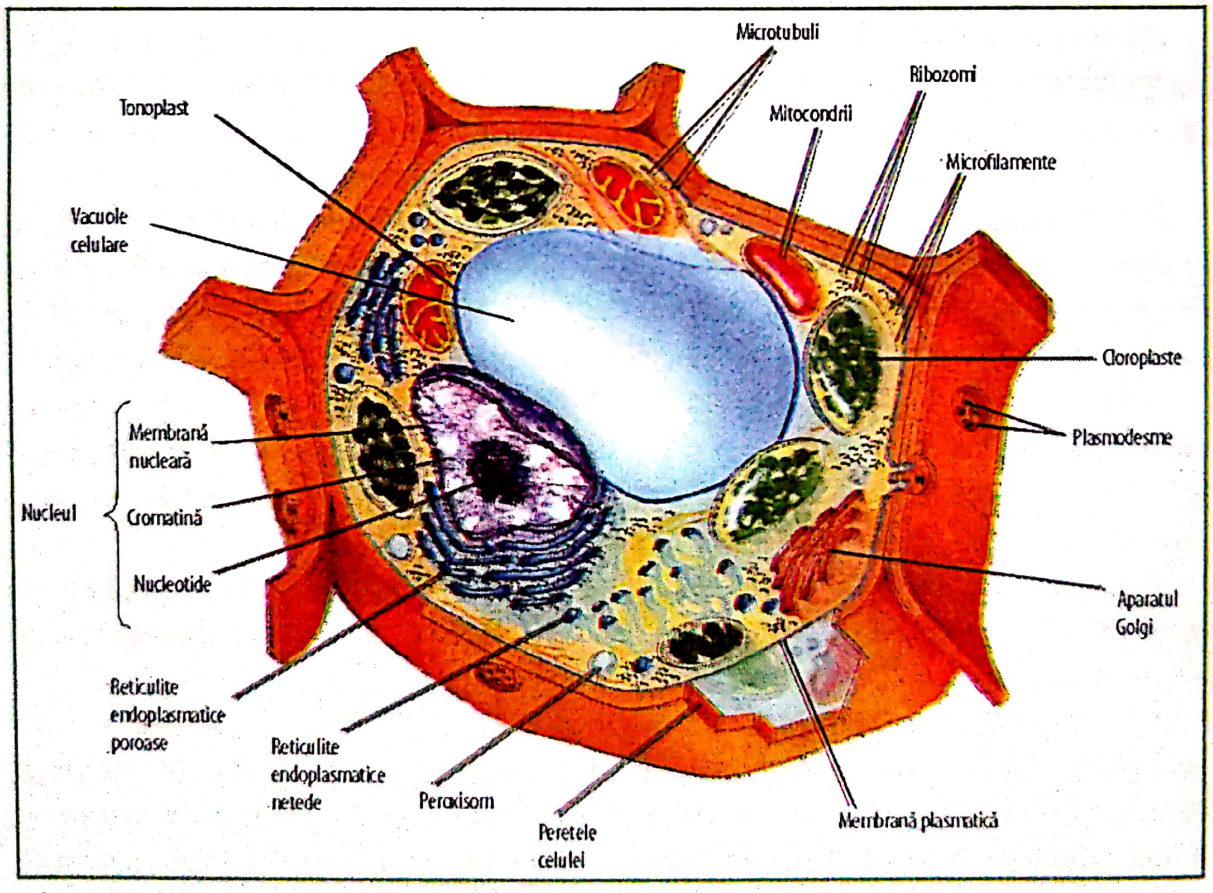


Fig. 2 – Celula și componentele ei la plante

Scanned with OKEN Scanner

Desenul din figura 2 arată că celulele plantelor sunt foarte asemănătoare cu cele ale animalelor, demonstrând unitatea lumii vii. Partea cea mai importantă a celulei este **nucleul**, înconjurat de o **membrană**.

Plasma este delimitată de o membrană înăuntrul căreia, în afară de nucleul şi subcomponentele lui se întâlnesc **organitele** sau organelele, precum **ribozomii**, un **sistem R.E. (reticulite endoplasmatice), aparatul Golgi, mitocondriile, peroxizomii, microfilamente şi microtubuli**. La plante lipsesc deci **lizozomii** şi **filamentele intermediare**.

În plus faţă de animale, celulele plantelor conţin **plastidele** reprezentate îndeosebi de **cloroplaste**, locul unde se desfăşoară fotosinteza în prezenţa fotonilor solari, a apei şi bioxidului de carbon şi unde se derulează prima reacţie creatoare de materie organică (energie chimică) sub formă de glucoză şi apoi alte molecule organice mai complexe.

În majoritatea celulelor vegetale se găseşte o organită care este cu atât mai mare cu cât planta este mai bătrână, denumită **vacuola celulară**, care conţine un fel de lichid. În acest lichid se înmagazinează diferite substanţe rezultate din degradarea unor macromolecule. Acestea înlocuiesc de fapt lizozomii din celulele animale şi prin presiunea interioară pe care o exercită joacă un rol important în creşterea plantei. Membrana vacuolei este cunoscută sub denumirea de **tonoplast**.

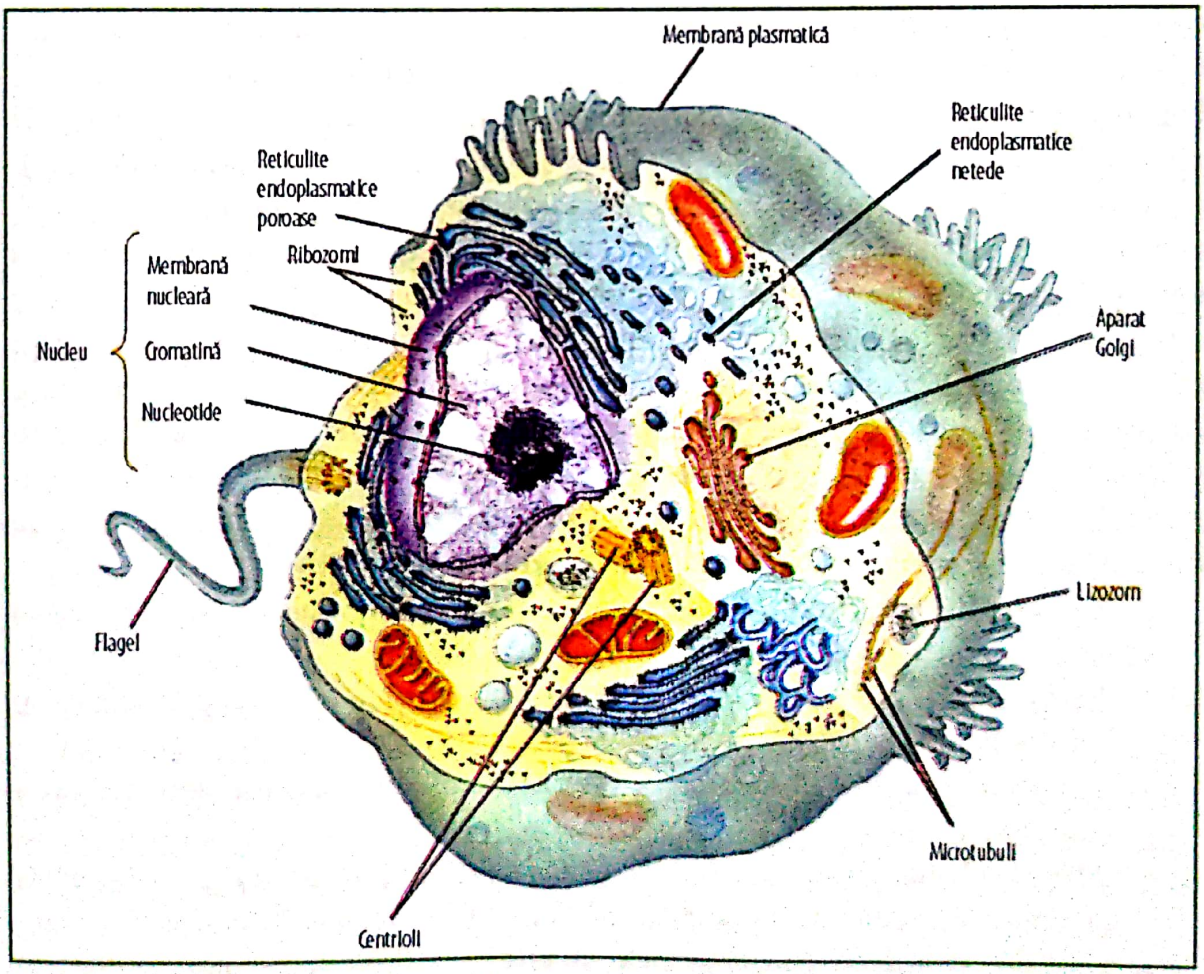


Fig. 3 – Celula şi componentele ei la animale

Scanned with OKEN Scanner

În afara membranei plasmidei la plante ca și la ciuperci este delimitată o membrană (perete) celulară foarte solidă. Ea este cea care dă formă și stabilitate celulei și o protejează împotriva unor degradări mecanice. Membrana celulară este penetrată de numeroase canale denumite **plasmodesme**. Prin acestea comunică citoplasma celulelor învecinate.

În cazul animalelor, nu există două celule identice ca asemănare. În citoplasma celulelor se găsesc numeroase organite, multe asemănătoare cu celulele din celulele plantelor. Majoritatea acestora sunt înconjurate cu o membrană, unele dintre ele - cum sunt **ribozomii**, nu au membrane.

Cea mai importantă organită este reprezentată de **nucleul celular**, locul în care se află **genele** (**fluidul moștenirii, al transmiterii ereditare**) sub formă de **ADN**. Împreună cu alte proteine, ADN-ul formează **cromatinele**, o aglomerare de structuri separate care alcătuiesc **cromozomii**. Aceștia pot fi recunoscuți ca formațiuni speciale numai în momentul reproducerii celulei.

Tot în nucleu se mai pot găsi un **nucleol** sau mai mulți nucleoli. Nucleolii ajută, alături de alte organite, la formarea ribozomilor. **Ribozomii** constituie practic retortele naturii în care are loc la o scară atât de mică **sinteza proteinelor**. Nucleul este delimitat în citoplasmă de un înveliș format din două membrane, membrane penetrate de tuburi poroase. Cele mai multe reacții de schimb ale substanțelor au loc în citoplasmă, adică în spațiul delimitat de membranele nucleului și membrana plasmatică. În acest spațiu citoplasmatic se găsesc numeroase alte organite foarte specializate, înglobate într-o substanță semifluidă, suficient de densă și care poartă denumirea de **citosol**. O mare parte a citoplasmei este ocupată cu **reticuli endoplasmatici** (R.E.), un fel de labirint membranos sub formă de saci aplatizați și de tuburi ocupate cu R.E. citoplasmatici. Există două forme de R.E.: cei **poroși**, ocupați de către ribozomi și cei **netezi**, sau netede dacă le spunem **reticulite**. Pe ribozomii legați de R.E. poroși se sintetizează un număr foarte mare de proteine. În același timp R.E. coparticipă într-o măsură foarte importantă la sinteza substanțelor care alcătuiesc membrana celulelor. **Aparatul Golgi** este o organită înconjurată și ea de o membrană și constă dintr-o grămadă aplatizată de saci membranoși. Ei sunt activi în sinteza, prelucrarea în continuare, înmagazinarea, sortarea și transferul, respectiv eliminarea produselor chimice din celulă. Alte organite înconjurate cu membrane sunt:

- **Lizozomii** care conțin un amestec de enzime de digestie și hidroliză a macromoleculelor;
- **Peroxizomii** care conțin enzimele oxidării substanțelor și nu numai, în procesele respiratorii;
- **Vezicula, granula și vacuole** cu funcții multiple privind depozitarea și schimbul de substanțe;
- **Mitocondriile**, adevărate uzine energetice ale celulei, care produc din substanțele organice ale celulei prin respirația celulei - ATP (ademintrifosfatul).

Citosolul, care include toate organitele, nu este deloc lipsit de structură, ci este traversat de o multitudine de filamente care alcătuiesc citoscheletul. Din rândul acestora

Scanned with OKEN Scanner

fac parte **microtubulii, microfilamentele şi filamentele intermediare**. Ele formează o reţea suficient de solidă care asigură forma şi stabilizarea celulei, dar care este şi suficient de flexibilă pentru a-i asigura o anumită capacitate de mişcare.

În desenul din figura 3 se observă că celula poartă un fel de coadă, un flagel, construit din microtubuli. În acest caz este vorba de celule speciale care necesită o capacitate de mişcare mai mare. ■

1.1.1. Nucleul conţine informaţiile genetice ale celulei

Cea mai mare parte a materialului genetic al celulei se află în nucleu. Anumite gene pot fi însă întâlnite şi în mitocondrii şi cloroplaste. Dacă mărimea unei celule este în jur de 5 µm la eucariote, nucleul are, de regulă, o mărime de 1-2 µm. El este învăluit de o membrană dublă formată din straturi lipidice în care sunt integrate molecule specifice de proteine.

Între cele două membrane se află un spaţiu intermediar de circa **20 până la 40 nm**. Membrana nucleară este prevăzută cu pori al căror diametru este **100 nm** (fig. 4 a şi b). Complexul de pori dirijează transportul anumitor macromolecule şi alte părţi organice din nucleu în celulă. Procesul este reversibil. Partea interioară a membranei este dublată de **nucleolamină**, un dispozitiv reticular format din fibre de proteine care oferă nucleului o formă stabilă (fig. 4 c şi e). Între timp se acumulează o serie de informaţii asupra existenţei unui **matrix nuclear**, un fel de împletitură nucleară care se întinde pe întregul volum al nucleului. Despre funcţiile acestuia vom vorbi în paginile următoare.

Cromatina reprezintă ansamblul format din ADN plus o serie de alte proteine (fig. 4a). Prin colorare, cromatina se prezintă în lumină la microscopul electronic ca o masă fără formă. În perioada înmulţirii, a divizării celulei, cromatina se coagulează şi devine din ce în ce mai groasă. Apoi se structurează şi apar **cromozomii**. Fiecare eucariotă are un număr caracteristic, specific de cromozomi. Spre exemplu, **celulele umane conţin 46 de cromozomi**. Excepţie fac numai celulele sexuale, spermatozoizii şi ovulele care, la om, fiecare deţin câte 23 de cromozomi.

Nucleotidul sau **nucleolus**, cum mai este definit, este cea mai vizibilă structură a nucleului, deoarece densitatea proteică este acolo mult mai mare. Nucleolul are o formă de bilă şi văzut la microscopul electronic se prezintă ca o masă colorată formată din granule şi fibre. Aici este locul unde se formează secvenţele, subunităţile ribozomale care apoi traversează porii membranelor nucleare, ajung în citoplasmă unde se recombină şi dau naştere ribozomilor în forma lor finală. Există cazuri şi celule al căror nucleu conţine 2 sau mai mulţi nucleoli. Acest număr depinde de specie şi de stadiul de dezvoltare al celulei. O funcţie importantă a nucleului constă în a dirija sinteza proteică în citoplasmă. Pentru aceasta se foloseşte de aşa-numitele molecule mesager formate din **acid ribonucleic ARN**. Acest mesager se marchează **mARN** (m de la mesager). Cu ajutorul ADN-ului care conţine informaţia necesară el este sintetizat în nucleu (**TRANSCRIERE**), i se transferă informaţia genetică necesară, ca apoi, sub această formă, această informaţie să fie transportată în citoplasmă. Acolo ea este dirijată şi înmagazinată în ribozomi unde are loc o traducere a planului genetic

Scanned with OKEN Scanner

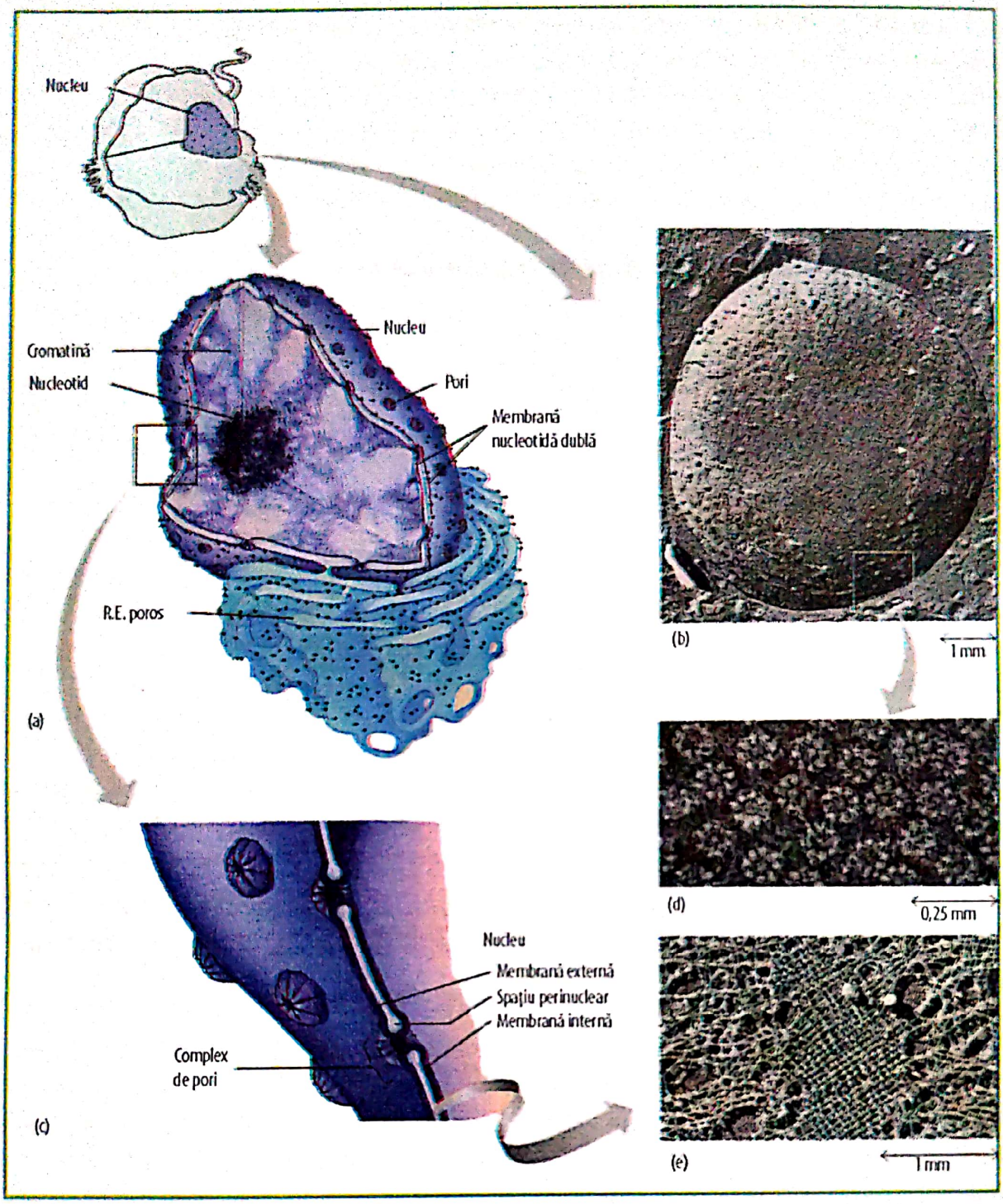


Fig. 4 – Schemă de detaliu a nucleului
(prelucrare după Campbell A. N., 2000)

de construcție a structurilor primare ale proteinelor ce trebuie sintetizate (fenomenul în sine se definește ca **TRANSLAȚIE**). Procedeul în detaliu al fenomenelor de transcripție și translație va fi prezentat într-un capitol viitor. Reținem din aceste date că ADN-ul este forma de conservare a materialului genetic ereditar. Spunem acest lucru pentru că așa cum se va vedea nu întreg ADN-ul celular sau nuclear este înzestrat cu capacitatea de a înmagazina și conserva informații. O mare parte din ADN este neutru, liber de sarcini și el ocupă la specia umană 20% din total. După alți autori,

Scanned with OKEN Scanner

acesta, adică ADN-ul care nu exprimă, s-ar ridica la om la peste 80-85%. ARN-ul se formează din ADN prin schimbarea unei baze, suficient însă pentru ca informația să poate fi transferată în ribozomi, acolo unde se află uzina de proteine. ■

1.1.2. Sinteza proteinelor în ribozomi

S-a arătat deja că **proteinele celulelor sunt sintetizate în ribozomi**. Celulele care au un mare potențial de sinteză proteică, dispun, firește, și de un număr mai mare de ribozomi, adică o structură care se potrivește unei anumite funcționalități. Spre exemplu, o celulă a ficatului uman conține câteva milioane de ribozomi. Aceleași celulele cu o sinteză proteică foarte activă conțin nucleoli deosebit de clari și în număr mai mare, tocmai pentru a exista baza de formare a ribozomilor.

Ribozomii produc proteinele în două segmente ale citoplasmei, și anume (fig. 5):

- în citosol unde ribozomii se găsesc împrăștiați;
- pe membranele exterioare ale reticulilor endoplasmatici unde se găsesc prinși numeroși ribozomi.

Proteinele sintetizate pe ribozomii liberi sunt în cea mai mare parte **enzime** și ele servesc în calitate de **catalizatori** numeroaselor procese de schimb de substanțe. În ribozomii legați de membrană se sintetizează proteine destinate construcției membranelor necesare învelirii **lizozomilor** și a al **altor organite celulare, ca și proteinele destinate a părăsi celula** și care intră în schimbul general **de substanțe ale organismului**.

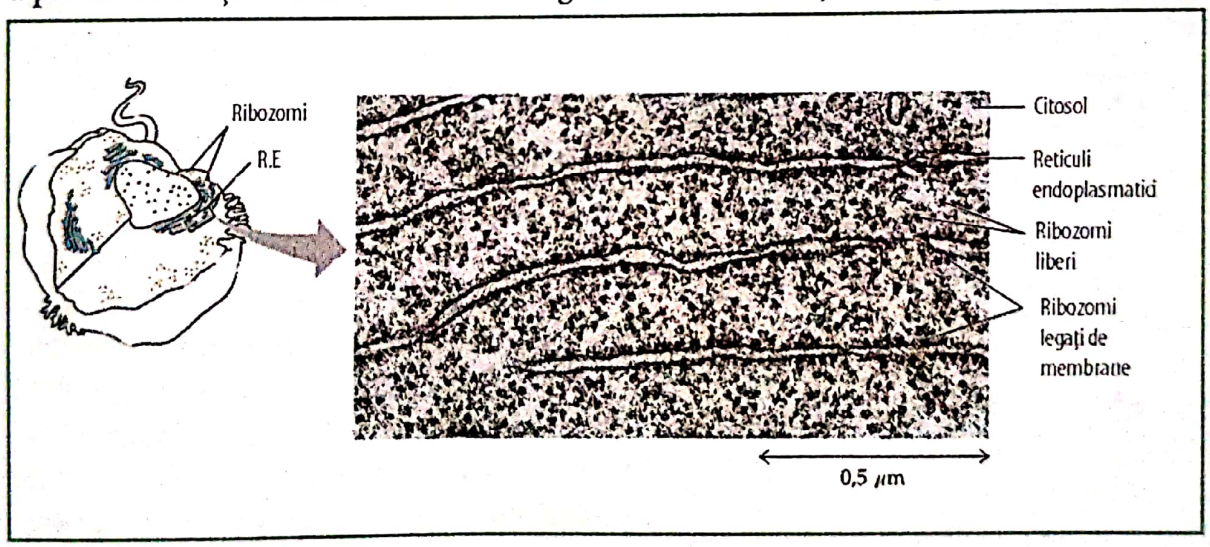


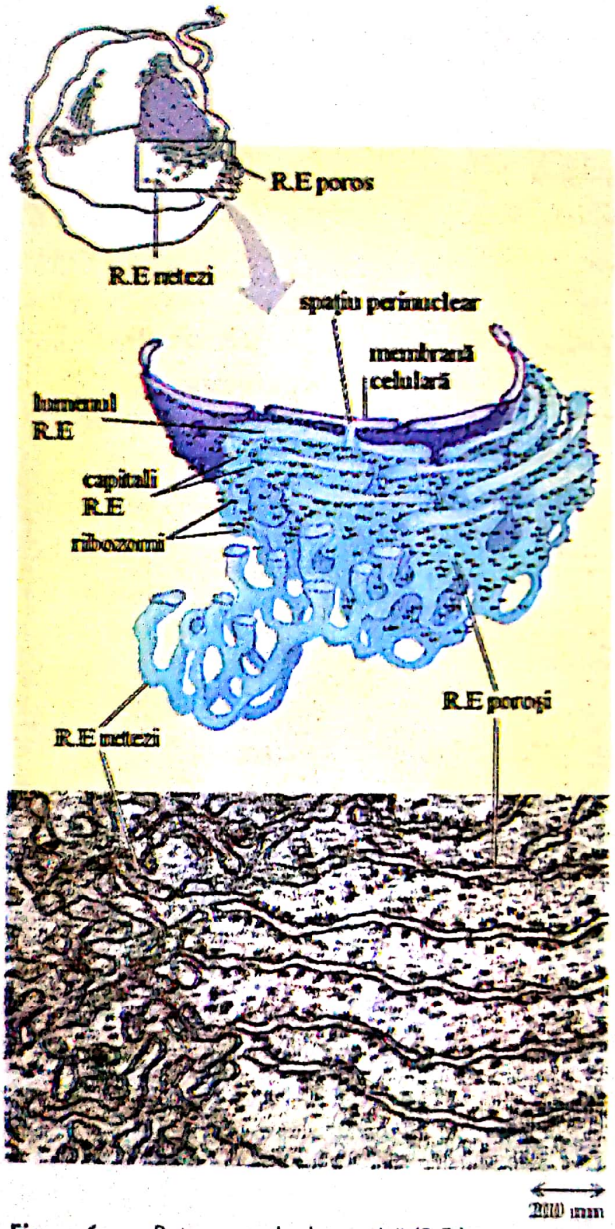
Fig. 5 – Fotografie la microscopul electronic (TEM) pe celule de pancreas care produc proteine hormon în cantitate foarte mare. Între ele se numără și insulina (*după Campbell, 2000*)

Celulele specializate în sinteza proteinelor, cum ar fi de exemplu cele ale pancreasului (fig. 5) ca și ale altor glande care secretă enzimele digestiei, conțin un mare număr de ribozomi legați de membrane. Ambele categorii de ribozomi au o structură asemănătoare și sunt schimbabili, înlocuibili: celulele își pot modifica numărul de ribozomi, ca și raportul dintre ei în funcție de schimbările stimulilor care modifică schimbul de substanțe. ■

Scanned with OKEN Scanner

1.1.3. Pe scurt despre reticulii endoplasmatici

Reticulii endoplasmatici sunt alcătuiți dintr-un labirint abundent de membrane. La eucariote ele constituie mai mult de jumătate din membranele celulei. Cuvântul **endoplasmatic** înseamnă în interiorul plasmei, adică al citoplasmei, iar **reticul** vine din limba latină și înseamnă rețea. Deci mai putem să-i spunem și **rețea endoplasmatică** (R.E.) și constă de fapt dintr-o împletitură, o țesătură de tuburi și saci membranoși care se lărgesc sus sub formă de cisterne (ladă, cutie în limba latină) sau cavitate, spațiu gol. În interior, lumenul R.E. este separat de citosol prin membrana RE. Membrana R.E. comunică direct cu învelișul nucleului, iar spațiul dintre membrane (lumenul) se află în legătură directă cu spațiul perinuclear.



R.E. este alcătuită din două structuri foarte legate una de alta: **R.E. netedă și R.E. poroasă (rugoasă).** R.E. netedă își trage numele de la faptul că membrana pe partea expusă citosolului nu poartă nici un ribozom. R.E. poroasă se vede poroasă la microscopul electronic deoarece membranele sale expuse citosolului sunt ocupate cu ribozomi. Aceiași ribozomi sunt prezenți chiar și pe partea interioară a nucleului, a membranei acestuia.

Funcțiunile R.E. netede

Coacționează în cazul diferitelor tipuri de celule, la facilitarea schimbului de substanțe și în mod deosebit la schimburile legate de transformarea hidraților de carbon, precum și la eliminarea substanțelor toxice și a medicamentelor.

– Cu ajutorul enzimelor produse de R.E. se realizează **sinteza acizilor grași, a fosfolipidelor, steroizilor și a altor grăsimi**. Printre steroizii fabricați se află și numeroși hormoni sexuali ai vertebratelor, ca și hormoni steroizi ai suprarenalelor. Spre exemplu, celulele testiculare și cele ovariene care produc

Fig. 6 – Rețeaua endoplasmatică (R.E.).
Un sistem care însumează membrane sub formă de saci și tuburi în legătură directă cu membrana nucleară (fotografie la microscopul electronic TEM*) (*desen prelucrat după Campbell A.N. - 2000*)

* TEM = transmisie electronică microscopică

Scanned with OKEN Scanner

asemenea hormoni deţin un număr mare de **reticuli netezi**, un model structural care, de asemenea, se potriveşte funcţiei pentru care a fost creat.

- Importanţa R.E. netede poate fi cel mai bine exemplificată de către celulele hepatice în care au loc modificările hidraţilor de carbon. În mod normal, în reticulii netezi sunt înmagazinate cantităţi importante de polizaharide sub formă de **glicogen.** Prin hidroliza acestuia se obţine **glucoza,** un produs energetic cu mare importanţă în coordonarea conţinutului şi activităţii sângelui. În continuare, prin arderea biochimică a glucozei din sânge, zahărul este eliminat din organism. Dacă sistemul nu funcţionează bine, din diferite motive, dintre care unul ar putea fi consumul excesiv de barbiturice, atunci fie că se acumulează prea mult zahăr în sânge şi se ajunge la diabet şi la injectare de hormon (insulină) în mod artificial, fie la apariţia unor enzime toxice care ar putea bloca înmulţirea, formarea de reticuli netezi cu consecinţe foarte grave pentru stabilitatea organismului (alcoolism, narcotism, ciroze).
- O funcţie, de asemenea, foarte importantă a R.E. netedă se adresează clar celulelor musculare. Aceste celule primesc prin „pompare" de către R.E. glato din citosol în lumenul lor ioni de calciu. Prin acţionarea unui impuls nervos adresat celulelor musculare, calciul este redirijat prin membrane R.E. înapoi în citosol şi asigură de acolo contracţia muşchilor.

Funcţiile R.E. poroasă, rugoasă

În mare, acestea sunt două:

- **sinteza proteică;**
- **producţia continuă de noi membrane.**

Sinteza proteică

Numeroase celule specializate care aparţin reţelei endoplasmatice aderentă la ribozomi produc şi elimină numeroase proteine (adică are loc o SECREŢIE). Celulele specializate ale pancreasului produc insulina pe care apoi o „elimină" şi o transferă în sânge. Această funcţie se corelează cu una aparţinând reţelei netede şi care va regla transformarea şi schimburile hidraţilor de carbon, în sensul că reprezintă o continuare a acesteia în buna funcţionare a organismului.

Fiecare lanţ polipeptidic care rezultă, care este fabricat de către ribozomii legaţi la o membrană este transferat prin porii membranei R.E. (care şi ei creează proteine) în lumenul acestora. Odată ajunse acolo, polipeptidele sunt tăiate, acestea revenind la forma lor nativă.

Se va vedea, mai ales în capitolele de final ale acestei lucrări, că obţinerea de proteine pe cale biotehnologică de calitate farmaceutică pleacă de la modelul natural de producere a acestora în ribozomi şi R.E. Inducerea unor gene specifice unor organisme inferioare cum ar fi ciupercile sau chiar bacteriile poate conduce la producerea unor proteine glicogenice foarte utile sănătăţii omului.

Cele mai „secretate proteine" sunt glicoproteinele care poartă legături hidrocarbonate covalente. Aceste grupe de molecule R.E. sunt fixate în interiorul membranelor

Scanned with OKEN Scanner

cu ajutorul unor enzime de către celulele specializate. Grupul hidrocarbonaților legați sub formă de glicoproteine nu sunt altceva decât oligozaharide, adică polimeri scurți care stau la baza moleculelor de zahăr. În primă fază, proaspăt secretatele proteine sunt ținute la distanță de cele secretate de ribozomi în citoplasmă. În faza a doua ele părăsesc R.E.-ul într-un mod special, și anume sub forma unor vezicule (băşicuțe) membranoase, desprinse, dezlegate de membrana R.E.

Asemenea băşicuțe, vacuole, care se mişcă prin celule, se numesc vezicule transportoare şi despre soarta lor vom vorbi puțin mai târziu.

Producția de membrane

Aşa cum am arătat mai sus, rețeaua endoplasmatică produce nu numai proteine ci şi membrane. Acest lucru se realizează astfel:

- Are loc o înmagazinare a fosfolipidelor şi moleculelor proteice.
- Între timp sau în paralel în ribozomi se sintetizează proteine membranoase care sunt şi ele transportate şi înmagazinate în membranele RE.
- Are loc o fixare a proteinelor membranoase cu segmente hidrofobe ale lanțului polipeptidic. În consecință, are loc creşterea membranelor şi înlocuirea materialului funcțional învechit.

Paralel, sinteza membranelor fosfolipidice se desfăşoară şi astfel:

Membranele R.E. adună laolaltă cu ajutorul unor enzime molecule fosfolipide disponibile în citosol. Membrana R.E. creşte în felul acesta şi poate dirija materialul acumulat în surplus sub formă de vezicul transportor spre alte părți ale sistemului membranos intern. ■

1.1.4. Aparatul Golgi - importanță, funcțiuni

S-a reținut că veziculele transportoare, după părăsirea RE, navighează prin citosol. O parte din ele sunt dirijate spre **aparatul Golgi**. Aparatul Golgi este o microuzină care fabrică, sortează şi livrează numeroase produse celulare spre locul lor de destinație.

Numeroasele produse puse la dispoziție de R.E. sunt aici transformate, depozitate şi apoi, primind noi funcții (îndeletniciri), sunt dirijate spre noul lor loc de muncă în celule. Este deci de aşteptat ca aparatul Golgi, specializat în prelucrarea tuturor secrețiilor celulei, să fie deosebit de cuprinzător atât ca funcții cât şi ca importanță. În fond el face să fie folosite toate secrețiile membranelor, care altminteri ar sufoca celula.

Constructiv, aparatul Golgi se prezintă sub forma unor cavități aplatizate, limitate de membrane, asemănătoare unor pungi sau unor plicuri (fig. 7 partea stângă), care se suprapun unul peste altul formând un fel de „stivă" denumită din latină şi **dictiosom** Frecvent o celulă poate să aibă mai mulți dictiosomi, adică mai multe stive, grămezi de asemenea pungi membranoase. Fiecare cavitate dictiosomală este, firește, înconjurată de propria ei membrană, care o separă de citosol. În apropierea aparatului Golgi se află numeroase vezicule transportatoare, procedeu asemănător vaselor care aşteaptă semnalul de intrare în port pentru a putea fi operate. Ele aduc materialul care face obiectul schimbului între aceste vezicule şi alte structuri celulare (după prelucrare).

Scanned with OKEN Scanner

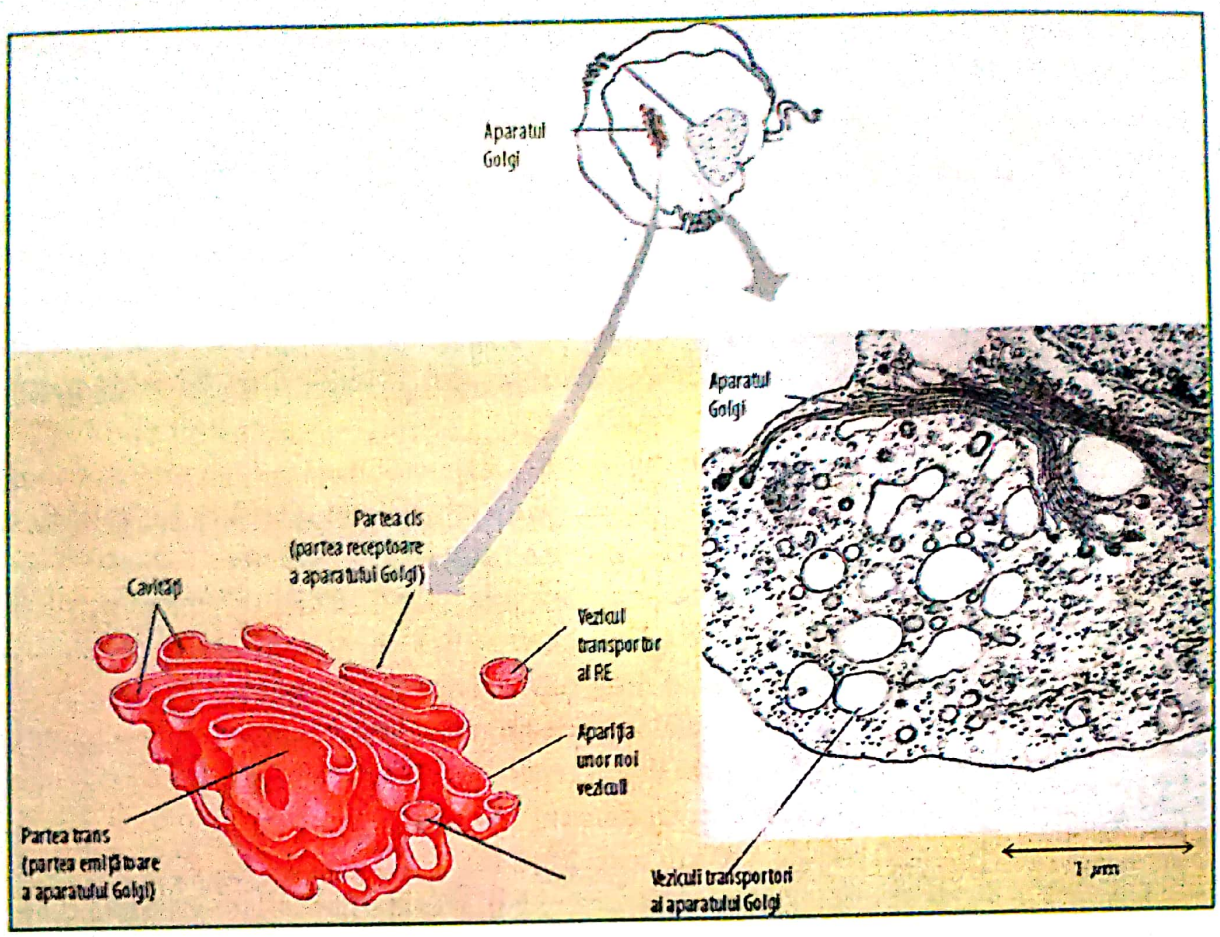


Fig. 7 – Aparatul Golgi desenat (stânga) şi fotografiat la microscopul electronic (dreapta) (TEM) *(prelucrat după Campbell A.N., 2000 –2003)*

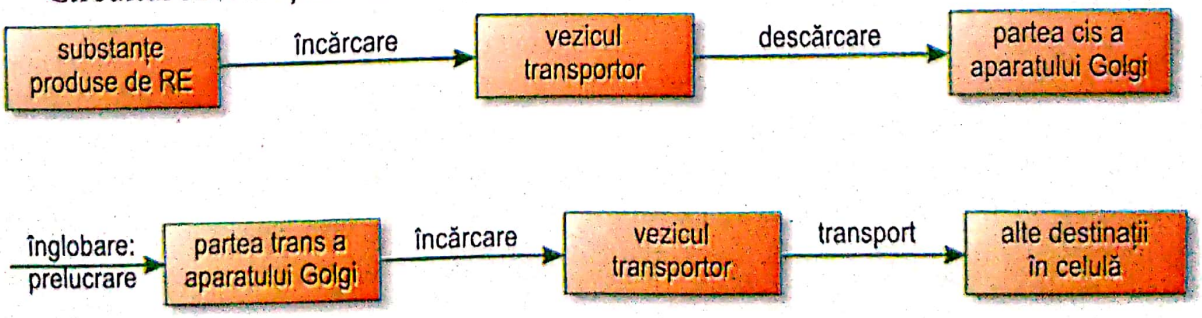
Se observă, mai ales în stânga, dispunerea pungilor membranoase (aici secționate) sub formă de stive. Funcțiile lui sunt acelea de a primi, prelucra şi expedia materiale elaborate de R.E. şi de a le redirija în celulă acolo unde este nevoie de ele.

Se observă deja în figura 7 că aparatul Golgi dispune de o polaritate sigură, cavitățile şi pungile prezentându-se ca având o parte convexă şi alta concavă. Acest aspect fizic (această structură) modificat imprimă însă şi funcții diferite.

Una din fațete, partea convexă, este denumită **cis (fațeta cis)** şi este acea parte în care produsele R.E. şi cele nucleice sunt depuse, sunt receptate (se mai numeşte şi partea receptoare - acolo unde intră materia primă pentru prelucrare).

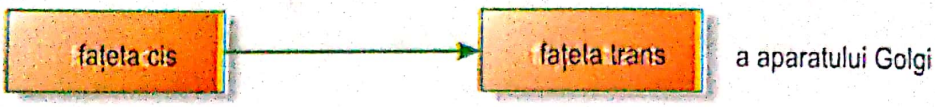
Cea de-a doua fațetă - fațeta cea concavă este denumită **trans (fațeta trans)** şi este locul pe unde materialul prelucrat părăseşte din nou aparatul Golgi.

Circuitul substanțelor este deci următorul:



Scanned with OKEN Scanner

De regulă, modificarea chimică a substanțelor aduse în aparatul Golgi în formele și structurile necesare celului are loc pe distanța:



Transformările au loc cu o viteză inimaginabilă, care depășește de peste 10^6 ori forța celui mai mare computer existent pe pământ în acest moment.

Moleculele nou formate sunt, în esență, de aceeași origine cu cele sosite pe fața cis, adică proteine, fosfolipide necesare membranelor și chiar oligozaharide parțial modificate de către enzime.

Important este însă altceva, și anume faptul că raportul în care apar aceste produse pe fața trans este acela ordonat, solicitat de către celelalte organite ale celulei, în vederea folosirii raționale în interiorul celulei a tuturor resurselor ei.

Aparatul Golgi fabrică însă nu numai molecule, ci și macromolecule și din acest punct de vedere literatura de specialitate exemplifică formarea unor polizaharide complexe cum ar fi **acidul hialuvic**, o substanță lipicioasă care își aduce o contribuție importantă la formarea, lipirea celulelor unor animale pluricelulare. Asemenea produse părăsesc aparatul Golgi tot prin fața trans, sunt transportate de veziculi transportori către membranele celulelor unde sunt înglobate, imprimându-le caracterul „lipicios", adică capacitatea de a se uni ușor între ele.

Rezultă din cele expuse mai sus că aparatul Golgi este un organit extrem de complet, ale cărui funcții și acțiuni sunt bine cunoscute. Ceea ce nu se știe cu exactitate și face acum obiectul cercetării biomoleculare este „de ce se întâmplă așa"? Procesul pare a fi condus genetic din interiorul nucleului. Acest lucru este demonstrat și de faptul că în cazul transportului unor proteine (**rob-proteine**, foarte importante pentru că sunt cotate ca molecule etichete – markeri – cu rol în reglarea genetică), veziculul transportor este acoperit cu o proteină denumită **clathrin**, exact pentru a o proteja pe prima. Alte detalii sunt, deocamdată, necunoscute. ■

1.1.5. Lizozomii - importanță și funcții

Importanța lizozomilor constă în aceea că ei digeră și curăță celula îndeosebi de macromoleculele nenecesare, adică de acel material care n-a putut fi prelucrat de aparatul Golgi. Se observă deci că diferitele organite ale celulei își completează funcțiile. Celula gândește ca un adevărat „creier" la toate necesitățile ei.

Constructiv, lizozomul nu este altceva decât un vezicul membranos asemănător cu veziculul transportor dar cu alte funcții (fig. 8). Ca funcție de bază, lizozomul constituie în egală măsură „stomacul" cât și „groapa ecologică a celulei".

În lizozom se află enzime destinate hidrolizei proteinelor, polizaharidelor, grăsimilor și acizilor nucleici, adică a celor mai importante grupe biologice de macromolecule. Acțiunea enzimelor este optimă în mediu acid, adică la un pH ≅ 5. Membrana lizozomilor dispune, într-adevăr, de un asemenea pH care face ca protonii (H^+) să fie pompați din citosol în spațiul interior al lizozomilor.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă lizozomul este avariat sau distrus, conținutul său enzimatic este vărsat în citosol unde, din cauza pH-ului neutru, devine practic inactiv. Mai trebuie menționat că, dacă aproape toți lizozomii sunt distruși și conținutul lor enzimatic este vărsat în citoplasmă, devine posibilă autodigerarea și deci distrugerea celulei. Acest lucru demonstrează încă o dată cât de importantă este compartimentarea celulei pentru propria ei funcționare și cât de ușor poate dispărea celula dacă aceste compartimente nu funcționează la parametrii „proiectați", adică optimi.

Lizozomul reprezintă deci un spațiu în care celulele pot să-și degradeze chimic macromoleculele, fără a distruge celula sub directa coordonare a enzimelor hidrolitice.

Enzimele hidrolitice și membranele lizozomului sunt fabricate de către R.E. și apoi transmise spre prelucrare-optimizare în aparatul Golgi. Ei, lizozomii apar din materialul primit de pe fața trans a aparatului Golgi.

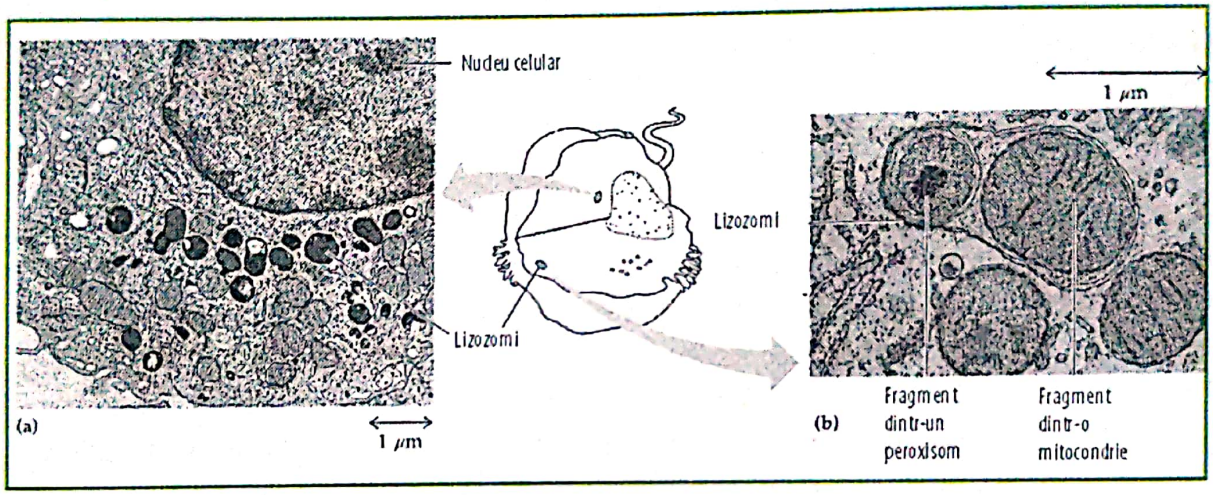


Fig. 8 – Lizozomii.
În foto stânga, făcută la microscopul electronic (TEM), lizozomii din sângele de șobolan sunt colorați închis, deoarece colorantul utilizat s-a legat de o enzimă digestivă. Asemenea „celule albe" - leucocitele din sânge omoară bacteriile și virusurile (creând sistemul imunologic) folosindu-se de lizozomi. În dreapta fotografiei sunt surprinse fragmente din alte organite din celulele sângelui, incluse pentru a fi digerate de lizozomii aceleiași celule, fenomen denumit autofagie

Lizozomii acționează în moduri extrem de diferite. În cazul protozoarelor, hrana acestora formată din bacterii și fragmente organice mai mici este inclusă în interiorul celulei și apoi condusă spre lizozomi unde este digerată. Fenomenul a căpătat denumirea de **fagocitoză** de la grecescul *phagein* pentru „a mânca" și *kytos* pentru „vas", deși prin vas trebuie să înțelegem celula în sine.

Urmare digestiei într-un lizozom primar (prin fagocitoză) rezultă suficiente substanțe pentru a crea „substratul" pentru un nou vezicul care la rândul lui se topește și dă naștere unui lizozom secundar denumit la protozoare și **„vacuolă nutritivă"** (fig. 9).

Anumite celule umane din sânge (**leucocitele** dar nu numai) sunt implicate în procesul de fagocitoză fiind în măsură să distrugă bacterii și virusuri în cantități foarte mari și care, așa cum am spus, stau la baza sistemului nostru imunologic.

Scanned with OKEN Scanner

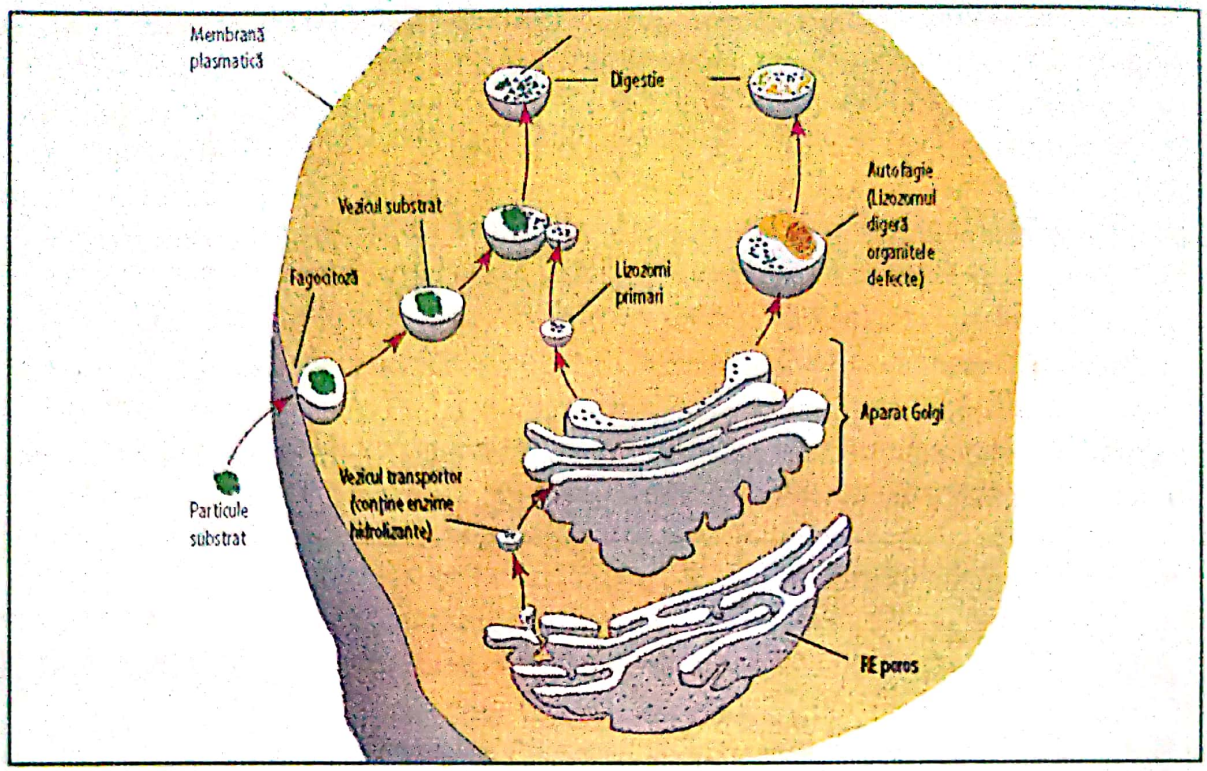


Fig. 9 – Formarea şi funcţionarea lizozomilor.
Lizozomii digeră substanţele preluate de celule şi pun la dispoziţia acestora rezultantele acestei digestii. În cazul fagocitozei, rezultatul acestei digestii dă naştere la un nou vezicul care o include. Acest nou vezicul se topeşte într-un lizozom primar din care rezultă apoi un lizozom secundar care prin hidorliză enzimatică digeră hrana. Urmare a hidrolizei se ajunge la zaharuri, aminoacizi şi alţi biomonomeri care apoi sunt transferaţi prin membranele lizozomilor în citosol unde servesc ca material de construcţie al celulei. Prin autofagie, lizozomii curăţă celula de resturile unor organite, iar materialul rezultat îl redau circuitului normal (recirculaţie, respectiv refolosirea unor materiale nefolosibile). Unele dintre ele pot reajunge în R.E. şi în aparatul Golgi

Programarea morţii celulelor, cunoscută sub denumirea de **APOPTOZĂ**, se face de către propriile enzime lizozomice şi constituie un procedeu extrem de important în dezvoltarea multor organisme vii. Aici venim cu un singur exemplu, şi anume: mâinile unui embrion uman au la începuturile sale o membrană care leagă degetele între el, aşa cum este cazul la păsările înotătoare (gâşte, raţe etc.). Mai târziu însă aceste ţesuturi dintre degete sunt digerate de către lizozomi. **Moartea programată a celulelor constituie în acest moment unul din cele mai active domenii de cercetare.** Aşadar apoptoza provoacă moartea celulelor, iar programarea acestei morţi este una genetică. Bunăoară, necrozele frunzelor nu au nimic în comun cu apoptasa. Apoptoza poate fi definită şi ca un proces fiziologic strâns controlat, care joacă un rol extrem de important pentru dezvoltarea, reproducerea şi îmbătrânirea diferenţiată a organismelor. Eliminarea anumitor celule se face întotdeauna planificat.

În cazul unor numeroase îmbolnăviri ce aparţin sistemului de „boli prin acumulare", schimbul de substanţe cu lizozomii este deranjat sau chiar blocat. Celor bolnavi le lipseşte una din enzimele hidrolitice care în mod natural este activă în organita res-

Scanned with OKEN Scanner

pectivă. Din această cauză se înmulțesc în lizozomi substanțele care nu pot fi digerate, care conduc la blocarea și a altor funcții ale celulei.

În cazul bolii „Pompe", ficatul este îmbolnăvit de către glicogen, pentru că acesta se acumulează în celule, tocmai datorită faptului că în lizozomi lipsește enzima pentru degradarea polizaharidelor.

Una alt exemplu îl constituie boala Tay-Sachs (de la oftalmologul englez Warren Tay, 1843-1927), în care caz lipsește din lizozomi enzima care degradează gangliosidele, sau aceasta, din motive diferite, este inactivă. Consecința o constituie mari degradări ale sistemului nervos central prin acumularea în creier a unei cantități explozive de substanțe grase.

Cel care a descris cel mai bine boala Tay-Sachs a fost neurologul Bernard Sachs (1854-1944). El o considera o boală ereditară recesivă, caracterizată prin modificări în sistemul nervos central, care provoacă deranjamente de tot felul, inclusiv motrice. Sunt prezente retardările intelectuale și moartea, care frecvent apar în anul 3 de viață. Enzima lizozomală care lipsește se numește β-xexosaminidază. În lipsa enzimei, gangliosidele Gm_2 se acumulează în celulele nervoase ale părții cenușii (gri) a creierului.

Prin ganglioside trebuie să înțelegem sfingolipide aparținând lipidelor membranei, adică grăsimi utile țesuturilor nervoase dacă nu se găsesc în exces. (*Lexicon der Biologie* – Robert Huber și colab., 2004). Din fericire pentru specia umană bolile prin acumulare sunt relativ rare. În viitorul apropiat și acestea vor putea fi tratate prin injectarea în sânge a enzimelor care lipsesc.

Calea cea mai bună pentru tratamentele în cauză va fi aceea a **utilizării unor gene care să producă enzimele lipsă exact în celulele care au nevoie.** ■

1.1.6. Vacuolele - importanță și funcții

În bugetul celulei ele îndeplinesc, de asemenea, numeroase funcții. Constructiv, vacuolele sunt asemănătoare veziculelor intracelulare de tip membranos. Funcțiile lor, așa cum am arătat, sunt foarte numeroase. A fost deja amintită funcția de nutriție pentru cele rezultate ca vacuole nutritive (vezi fig. 9).

- Numeroase protozoare de apă dulce din zonele noastre dispun de așa-numitele vacuole contractile, destinate pompării apei în exces din celule.
- Celulele plantelor mature conțin, de regulă, o vacuolă centrală învelită într-o membrană denumită tonoplast (fig. 10).
- Vacuolele celulare ale plantelor sunt pline cu lichid și reprezintă un compartiment cu funcții foarte diverse.
- Depozitează legături organice, îndeosebi proteine care apoi sunt constituite ca depozite în celulele semințelor.
- Reprezintă un rezervor al celulelor pentru anioni anorganici cum sunt potasiul și clorul.
- Se preocupă de schimbul și eliminarea substanțelor toxice, dăunătoare.
- Digeră anumite macromolecule și le pregătesc funcțional pentru a fi preluate de către lizozomii celulelor animale. Un model biologic de pregătire a plantelor pentru a fi consumate de către animale.

Scanned with OKEN Scanner

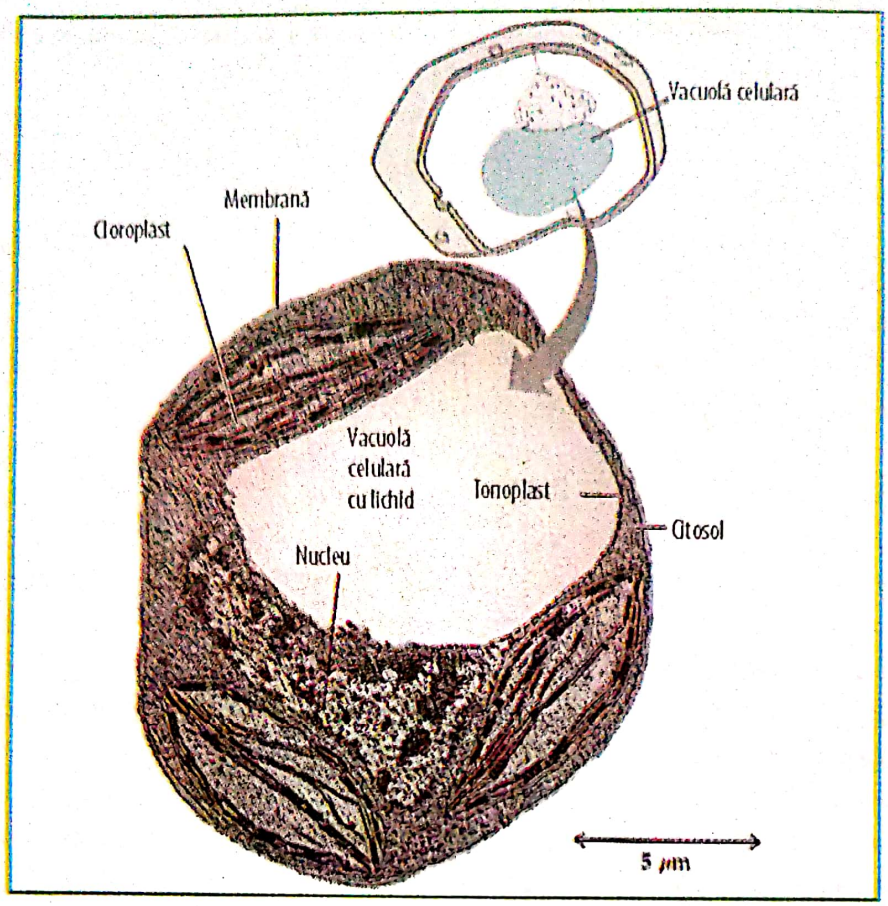


Fig. 10 – Vacuolă celulară cu lichid la plante (TEM) (*prelucrare după Campbell Neil A., 2000*).
La celulele plantelor adulte, vacuolele ocupă 80% din volumul acestora sau chiar mai mult. În acest caz, citoplasma se retrage într-o zonă îngustă între vacuole şi membrana plasmatică. Tonoplastul separă citosolul de lichidul vacuolar. Tonoplastul selectează substanţele produse de biomembrană, motiv pentru care sucul vacuolar are o cu totul altă compoziţie decât citosolul.

- În vacuolele anumitor plante, mai ales în flori, se află pigmenţi roşii, galbeni, albaştri etc., care atrag insectele în scopul polenizării.
- Vacuolele anumitor plante conţin substanţe repelente sau toxice, care protejează planta contra agresiunii animalelor.
- Funcţia de a ajuta creşterea plantelor prin creşterea celulei
  - Prin osmoză, vacuola absoarbe apă, existând pentru aceasta o presiune internă care permite creşterea celulei fără creşterea volumului citoplasmatic.
  - Vacuola mare, plină cu lichid, a apărut prin fuzionarea unor mici vacuole prezente în interiorul reţelei endoplasmatice şi a aparatului Golgi.
  - Ţinând cont de aceste corelaţii, vacuola devine în integralitatea ei o parte a sistemului intern membranos.

* *
*

Scanned with OKEN Scanner

Următorii paşi în studiul nostru constau în prezentarea a trei modele de organite care nu mai au o corelaţie strânsă cu sistemul membranos intern. Este vorba de peroxizomi, mitocondrii şi cloroplaste.

1.1.7. Peroxizomii - alcătuire, funcţii

Peroxizomii se mai numesc **microbodii** şi sunt organite specializate, alcătuite dintr-un vezicul (veziculă) singur, înconjurat de o membrană. Specializarea lor constă în faptul că aceştia conţin enzime, îndeosebi oxidative, care eliberează hidrogenul din diferite substraturi, şi care apoi, împreună cu oxigenul, formează peroxidul (H_2O_2). De la acest proces îşi trage numele organita (peroxizom) (fig. 11).

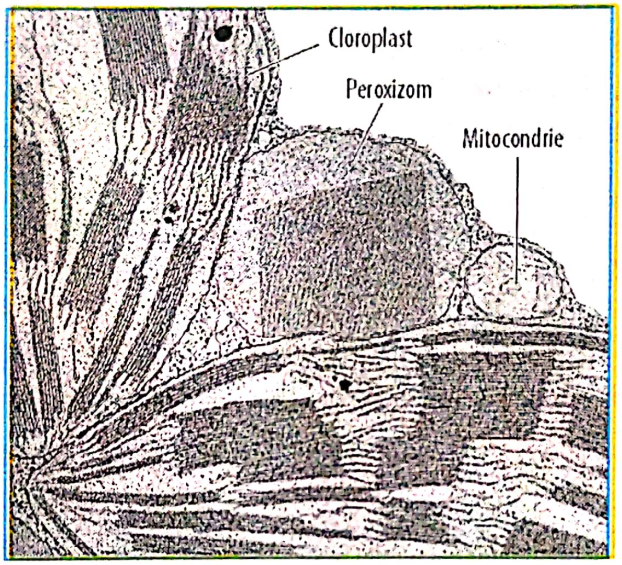


Fig. 11 – Peroxizomii.
Organite asemănătoare unei bile, care uneori dispun şi de un nucleu cristalin grăunţos, format din molecule enzimatice dense. Peroxizomul din această fotografie electronică a fost localizat în celulele frunzelor. De aceea se observă legătura lui strânsă cu cloroplastele şi mitocondriile cu care realizează împreună anumite schimburi de substanţe (TEM) (*Alberts şi colab., 1995*)

Aceste reacţii ar putea servi mai multor scopuri:

Anumiţi peroxizomi descompun oxidativ acizii graşi în molecule mai mici. Aceştia ajung în mitocondrii unde sunt utilizaţi ca materii prime în respiraţia celulei. Peroxizomii din ficat îndeplinesc funcţia detoxificării prin degradare, ardere a alcoolului, şi a altor substanţe periculoase, exact prin separarea hidrogenului şi legarea lui de oxigen. În procesul de schimb se obţine peroxid care, la rândul său este extrem de toxic. Peroxizomii însă dispun de o altă enzimă catalitică ce transformă urgent peroxidul în apă şi oxigen (în procesul oxidativ se foloseşte însă mai mult oxigen decât cel regenerat, ceea ce înseamnă că el este luat din altă parte).

Blocarea unei enzime care produce peroxid într-o organită a celulei, în care de fapt se produce la comandă o altă enzimă care favorizează schimbul, este un alt exemplu despre modul în care celula decide să-şi creeze structuri pentru buna ei funcţionare.

Scanned with OKEN Scanner

O anumită categorie de peroxizomi specializați denumită **glioxizomi** se întâlnesc în țesuturile de depozitare ale semințelor plantelor oleaginoase. În aceștia se găsesc enzime pentru degradarea oxidativă a acizilor grași, o etapă premergătoare pentru utilizarea uleiului ca energie în procesul de germinare a semințelor, etapă care acoperă perioada dintre germinație și începerea fotosintezei, respectiv hrănirea proprie a tinerelor plantule.

Peroxizomii nu se formează pe membranele lizozomilor, ci în mod specific se formează printr-o comandă genică din proteinele și lipidele citosolului. Ei se înmulțesc prin diviziune și cresc până ating dimensiunile uzuale.

1.1.8. Mitocondriile și cloroplastele - constituție, funcții

Sunt organite extrem de importante în bilanțul energetic al celulei conform principiului lui Campbell cum că „celulele sunt sisteme deschise care transformă în permanență energia preluată din mediu". La eucariote, mitocondriile și cloroplastele sunt organitele specializate pentru aceste servicii.

Mitocondriile reprezintă acel spațiu, acel loc din celulă în care se desfășoară respirația celulei, precum și activitățile premergătoare și pregătitoare ale schimbului de substanțe care provin din zahăr, grăsimi și alte substanțe nutritive. În acest proces biochimic se câștigă energie care este apoi transformată în ATP (adenintrifosfat).

Cloroplastele reprezintă spațiile celulare (organitele) în care se desfășoară **fotosinteza**. Ele transformă energia solară în energie chimică, prin preluarea sub formă de fotoni a acesteia ca energie pentru transformarea apei și a bioxidului de carbon în glucoză, prima materie organică de biosinteză (situația este prezentă numai la plante). Amândouă organitele sunt înconjurate de membrane care însă nu au nici o legătură directă cu sistemul membranos intern al celulei. Proteinele de construcție ale membranelor mitocondriilor și cloroplastelor sunt produse în ribozomii din citosol sau în ribozomii prezenți în interiorul lor. Pe lângă ribozomul prezent în interiorul lor, cele două organite mai dețin și scurte lanțuri de ADN cu rol în declanșarea sintezei proteinelor (parțial pentru că cea mai mare parte este sintetizată în citosol).

Mitocondriile se găsesc în aproape toate celulele eucariotelor. Există cazuri când celula deține numai un singur mitocondrium. Cele mai multe celule (funcție de specie și poziția evolutivă), îndeosebi cele cu o bogată activitate de schimb de substanțe, dispun de sute, uneori mii de asemenea organite. Dimensiunea lor în lungime este între 1 și 10 μm, plutesc în citoplasmă și se deplasează continuu. Fiecare mitocondrie este de fapt înconjurată de două membrane diferite, fiecare dintre ele fiind alcătuită dintr-un strat dublu de fosfolipide cu o dotare specială pentru înmagazinarea proteinelor (fig. 12).

Membrana exterioară este netedă, iar cea interioară dimpotrivă prezintă numeroase pliuri. Ea a căpătat denumirea de Cristae. Membranele delimitează interiorul mitocondriei în două compartimente:

- Primul este delimitat de membrana interioară și a căpătat denumirea de **matrix**. Acesta conține ribozomi ca și segmentul circular de ADN mitocondrial,

Scanned with OKEN Scanner

precum şi numeroase enzime care favorizează transformarea şi schimburile hidraţilor de carbon şi ale grăsimilor. Tot în matrix se desfăşoară o serie de reacţii necesare respiraţiei celulei. Se mai întâlnesc proteinele şi enzimele care servesc la sinteza ATP.

- Al doilea este spaţiul dintre cele două membrane, mult mai redus şi serveşte ca depozit de substanţe.

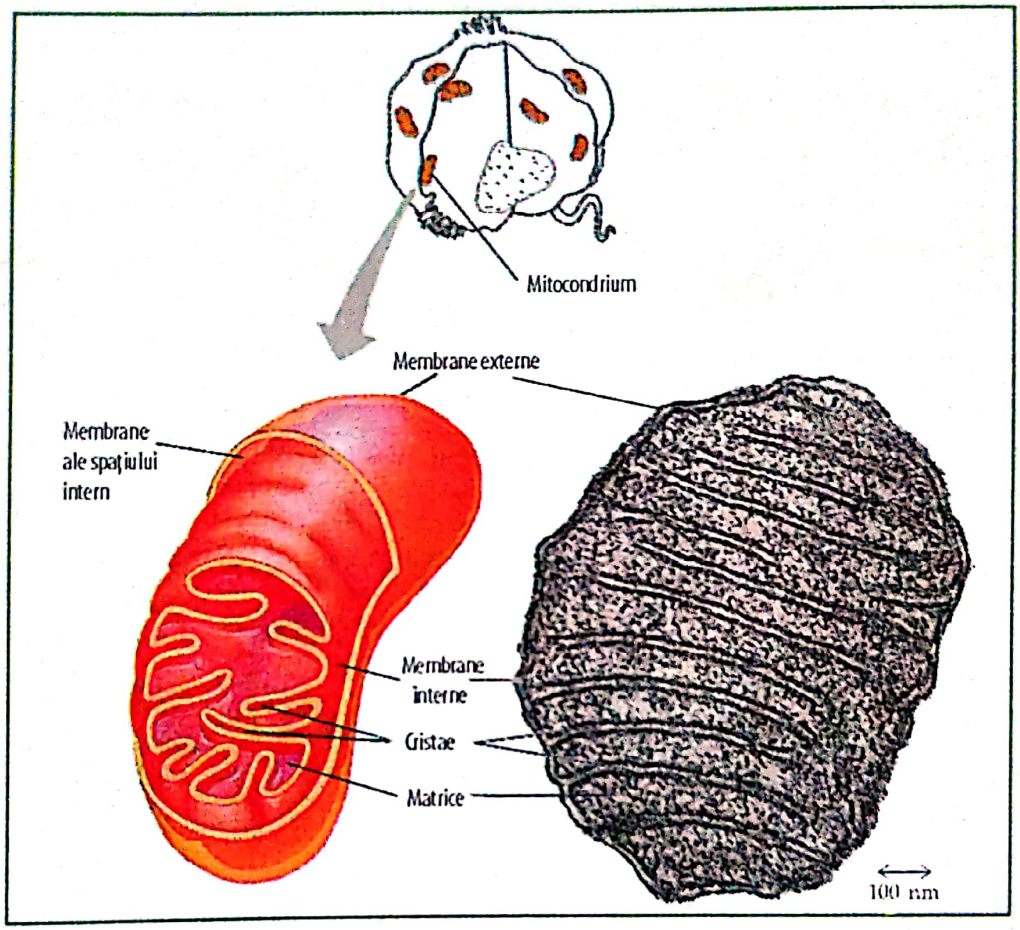


Fig. 12 – Mitocondria sau mitocondrium.
Locul unde are loc respiraţia celulei. Atât pe desen cât şi pe fotografia la microscopul electronic (TEM) se observă membranele duble Cristae. Acestea prezintă pliuri, pentru mărirea suprafeţei. Secţiunea prin desen (stânga) prezintă mai bine legătura dintre membrane şi compartimentele delimitate denumite matrice (matrix) (*prelucrare după Nowak R., 1994*)

Cloroplastele sunt organite aparţinând grupei plastidelor şi care se întâlnesc numai la plante. Amiloplastidele sunt plastide necolorate care înmagazinează amidon, mai ales în rădăcini şi tuberculi.

Cloroplastele sunt bogate în pigmenţi, oranj în fructe, galben în petale şi verde (clorofila) în frunze. Alături de ei se mai întâlnesc enzime şi alte molecule care servesc fotosinteza ca sursă de nutriţie. Cloroplastele seamănă cu un bob de linte ca formă, având un diametru de 1-5 μm şi se găsesc în frunze, în organele verzi şi în protozoarele monocelulare - tip plante (fig. 13).

Scanned with OKEN Scanner

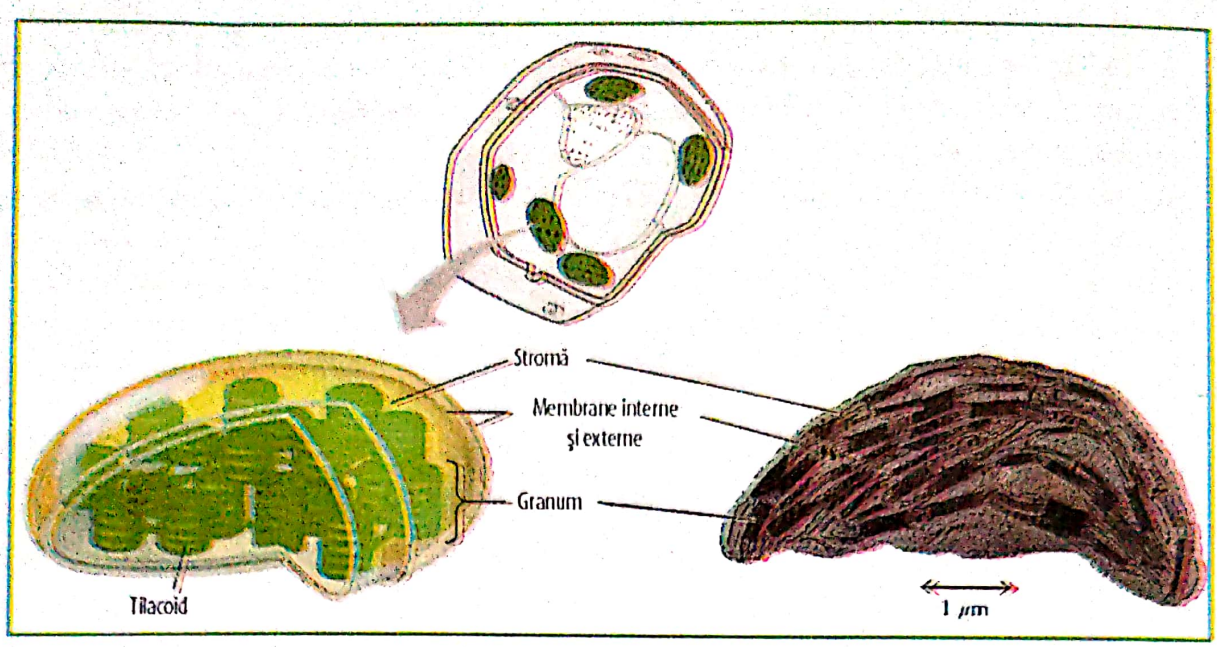


Fig. 13 – Cloroplastele, locul unde se desfăşoară fotosinteza.
Ca şi mitocondriile, sunt învelite de două membrane, între ele delimitându-se un spaţiu foarte îngust. Membranele interne delimitează un compartiment denumit stroma. Acesta, la rândul său, înconjoară pe un al treilea, delimitat de propria sa membrană. Tilacoidele desemnează nişte saci membranoşi prezenţi peste tot în cloroplaste şi denumite grane. Tilacoidele unui granum comunică între ele prin stroma (*prelucrare după D.Duvec, 1992 şi Campbell N., 2002*)

Conţinutul cloroplastelor este separat de citosol printr-un înveliş format din două membrane între care se află un spaţiu îngust. În interiorul organitei se află un al doilea sistem de membrane de forma unor discuri, care sunt nişte veziculi aplatizaţi denumiţi tilacoide.

În anumite zone, tilacoidele sunt aşezate una peste alta formând un fel de coloană denumită grană (plural grane). Spaţiul care adăposteşte tilacoidele şi granele este denumit STROMĂ. Membranele tilacoidelor separă interiorul cloroplastelor în 2 compartimente:

- **lumenul tilacoidal;**
- **stroma.**

Ca şi mitocondriile, cloroplastele alunecă probabil folosind ca şină de ghidare citoscheletul. ■

1.1.9. Citoscheletul

Reprezintă structura de rezistenţă a celulelor şi ajută la mişcarea, respectiv deplasarea celulei.

Prin evoluţia investigaţiilor cu microscopul electronic s-a putut constata că acesta este format dintr-o reţea de filamente care străbate celula dintr-o parte într-alta şi care a căpătat denumirea de **citoschelet** (fig. 14).

Citoscheletul are sarcina de a asigura stabilitatea mecanică a celulei, precum şi pe cea a formei acesteia, mai ales la celulele animale care au membrane celulare slabe. Prin modul său

Scanned with OKEN Scanner

de ancorare, anumite enzime şi organite sunt fixate pe un loc predestinat în celulă. El oferă, de asemenea, celulei posibilitatea de a-şi modifica forma şi, cu ajutorul unor aşa-numite proteine-motor (specializate în acest sens), care ajută la deplasarea celulei (fig. 15).

Componente ale citoscheletului induc mişcarea cozilor şi a cililor, precum şi contractarea musculaturii. Mişcarea pseudopodelor la amoebe şi a lichidului citoplasmatic cristalin la plante este, de asemenea, cauzat de citoschelet.

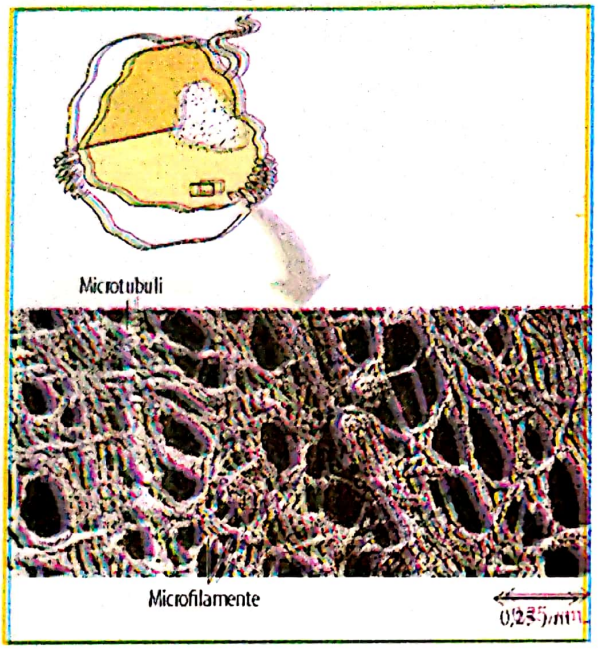


Fig. 14 – Citoscheletul.
El conferă formă şi rezistenţă celulelor animaliere, menţine fixe anumite organite şi ajută la deplasarea altora. Împrumută întregii celule capacitatea de a-şi modifica forma şi de a se putea deplasa. Pe fotografia microelectronică se observă, de asemenea, microtubuli şi microfilamente (TEM) (*după Campbell A. Neil – 2000*)

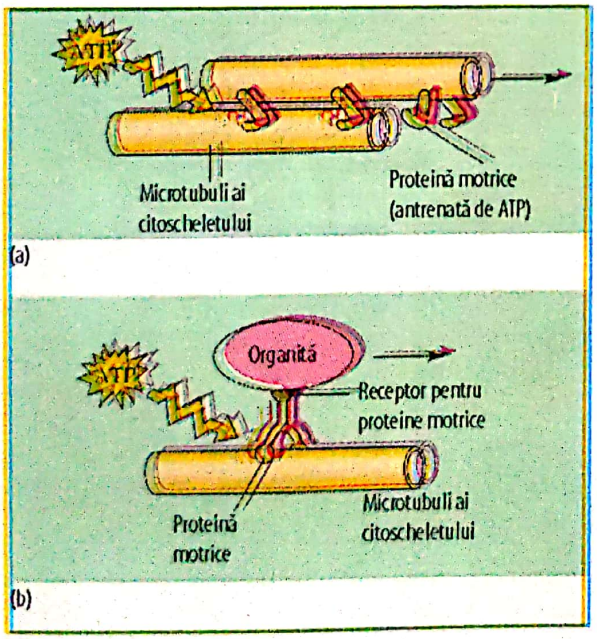


Fig. 15 – Proteinele motrice şi citoscheletul.
Acestea sunt alcătuite din microtubulii şi microfilamentele citoscheletului şi servesc pentru mişcarea, deplasarea celulei. Ele se află într-o acţiune de schimb cu complexul proteic şi de aceea sunt denumite proteine motrice. Mai servesc la stabilitatea formei sau, dimpotrivă, la schimbarea formei. Modificarea configuraţiei se face cu ajutorul ATP. Pentru a ajunge în interiorul organitei mamă se pot prinde de veziculă şi alte organite care le deplasează la locul lor de manifestare (*după Campbell A. Neil – 2000*)

Filamentele (fire extrem de subţiri) citoscheletului sunt alcătuite din cel puţin 3 familii diferite de proteine:

- cele mai groase dintre ele alcătuiesc microtubulii;
- cele intermediare sunt, în general, fire de legătură;
- cele mai fine alcătuiesc aşa-numitele microfilamente denumite şi **actinfilamente.**

Scanned with OKEN Scanner

1.1.10. Microtubulii

Se găsesc în citoplasma celulelor tuturor eucariotelor. Ele se prezintă **fizic** ca nişte tuburi goale cu un diametru de circa 25 nm şi o lungime de 200 nm → 25µm. Pereţii tuburilor sunt alcătuiţi din tubuline, proteine globulare care se întâlnesc în două forme surori: α **tubulină** şi β **tubulină**. Creşterea în lungime a microtubulilor se face prin adăugarea de noi molecule de tubuline la extremităţile lor. Microtubulii pot fi „construiţi" şi în alte părţi ale celulei, adică în acele zone unde tubulinele sunt prezente şi disponibile.

Funcţional microtubulii oferă suportul care imprimă stabilitate celulei, dar în acelaşi timp oferă **„şina"** de deplasare a diferitelor organite prevăzute cu **proteine-motor** (vezi fig. 15). În felul acesta se presupune că sunt transportaţi veziculii secretori de la aparatul Golgi către membranele plasmatice.

În timpul divizării celulei, microtubulii participă, de asemenea, la separarea cromozomilor.

În numeroase celule, mai ales la animale, în microtubuli se formează aşa-numitele CENTRE DE ORGANIZARE, cum ar fi **centrosomul**, un domeniu bine definit în apropierea nucleului. În celulele animaliere în acest centrosom ieşit din microtubuli se află o pereche de **centrioli**, fiecare format din nouă microtubuli aşezaţi în formă de cerc, provenind de la cele 3 grupe (fig. 16).

În procesul divizării celulei, în prealabil se dublează numărul de centrioli. Centriolii contribuie la organizarea aparatului microtubular, dar nu sunt necesari tuturor eucariotelor.

Celulele celor mai multe plante nu dispun de centrioli.

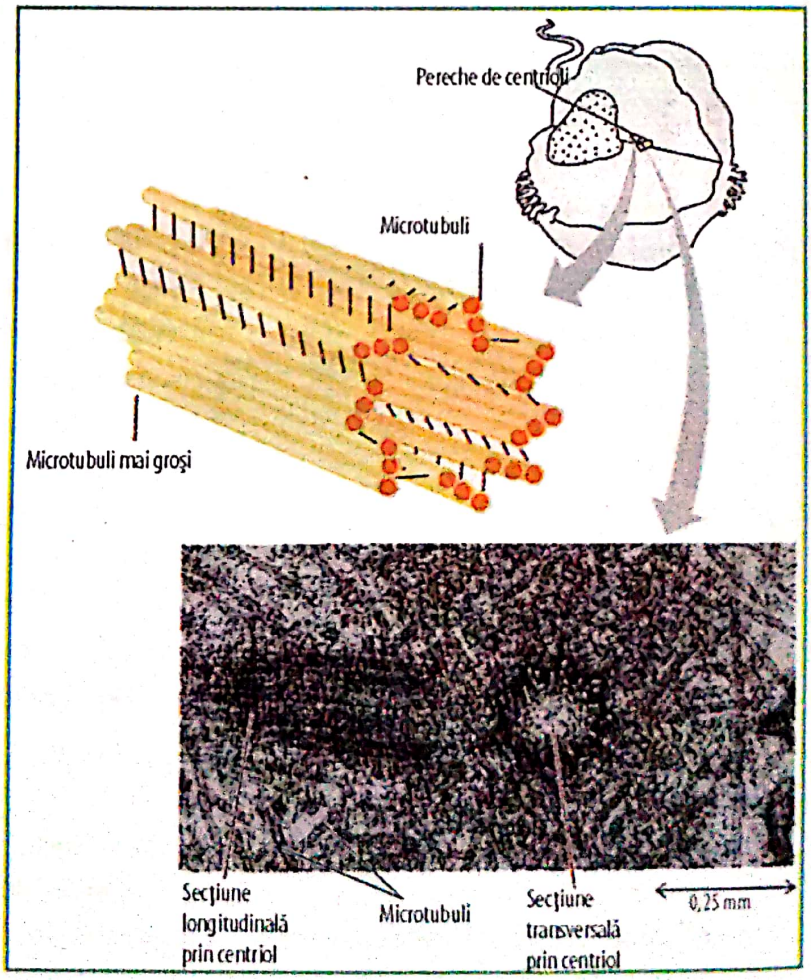


Fig. 16 – Centrioli.
Se găsesc sub formă de perechi în centrozomul celulelor animaliere într-o zonă apropiată nucleului şi sunt formaţi în interiorul microtubulilor de unde ies în forma finală. Centriolii, fiecare cu un diametru de 250 nm (0,25 µm) sunt ordonaţi sub formă de unghi drept unul în raport cu altul; alcătuiţi din 9 x 3 grupe de microtubuli (TEM) (*prelucrare după Campbell, 2000 şi Lodish şi colab., 1996*)

Scanned with OKEN Scanner

Flagelii şi cilii reprezintă structuri speciale alcătuite din microtubuli şi servesc la eucariote în a imprima ritmul bătăilor necesare mişcării celulei. Ei servesc la deplasarea prin apă a unor protozoare ca şi la deplasarea celulelor sexuale, îndeosebi a spermatozoizilor. Există o diferenţă între flageli şi cili (fig. 18) în sensul că cilii sunt mult mai numeroşi aşezaţi pe suprafaţa celulelor şi se mişcă diferit, numărul bătăilor fiind cu mult mai mare decât în cazul cililor.

În figura 17 se prezintă structura şi funcţiunile principalelor componente ale citoscheletului.

Proprietăţi	Microtubuli	Microfilamente	Filamente intermediare (IF)
Structura	Tuburi goale din 13 coloane alcătuite din monomeri ca pereţi	Două fire răsucite din monomeri	Fire mai groase alcătuite din fibre proteice
Diametru	25 nm; lăţime 15 nm	7 nm	8-12 nm
Monomeri	dimeri legaţi } α-tubuline, β-tubuline	Actin	În funcţie de tipul celulei diferite proteine IF aparţinând unor familii mari (keratine, vimetine, desmine, neurofilamentproteine şi altele)
Funcţiuni (sinteză)	mişcarea celulei (de ex. cili şi flageli) ordonarea cromozomilor transport organele stabilizarea formei celulei	contracţie musculară circuite citoplasmatice mişcarea celulei divizarea celulei (formarea pliurilor de divizare) stabilizarea celulei modificarea formei celulei	scheletul celulei stabilizarea formei celulei rezistenţa celulei ancorarea nucleului stabilizarea kernlaminei

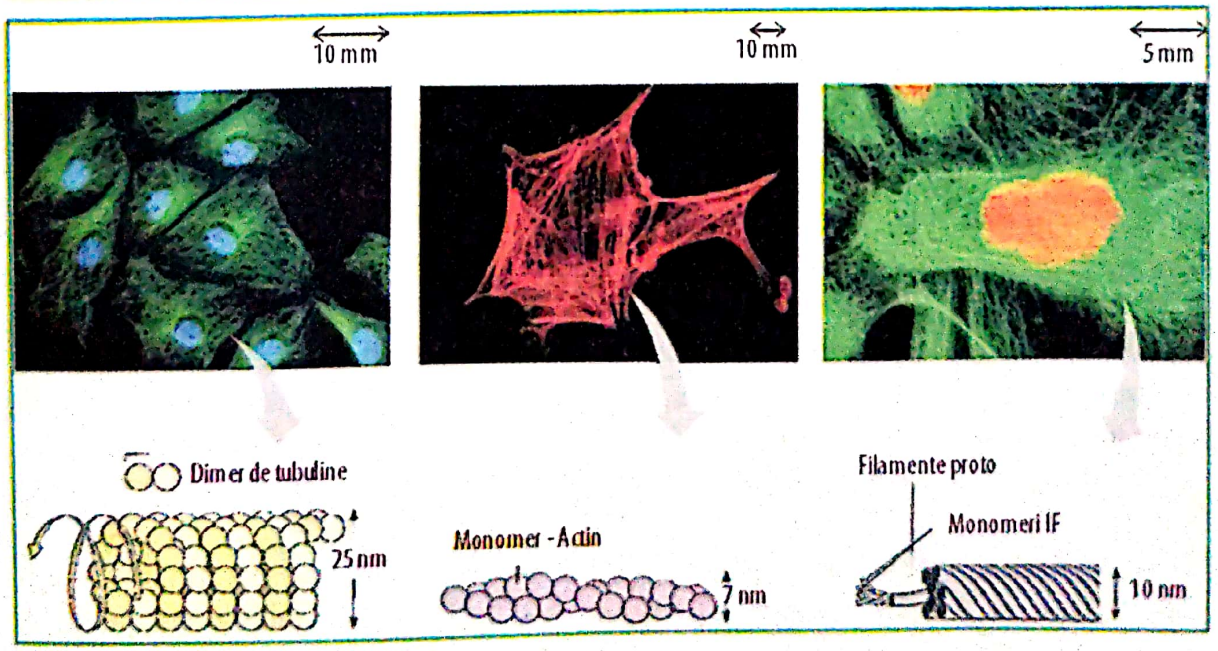


Fig. 17 – Structura şi funcţiile componentelor citoscheletului.
Un dimer constă din 2 molecule identice legate între ele (*după W.M. Becker şi colab. – The world of the cell, citaţi de Campbell, 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

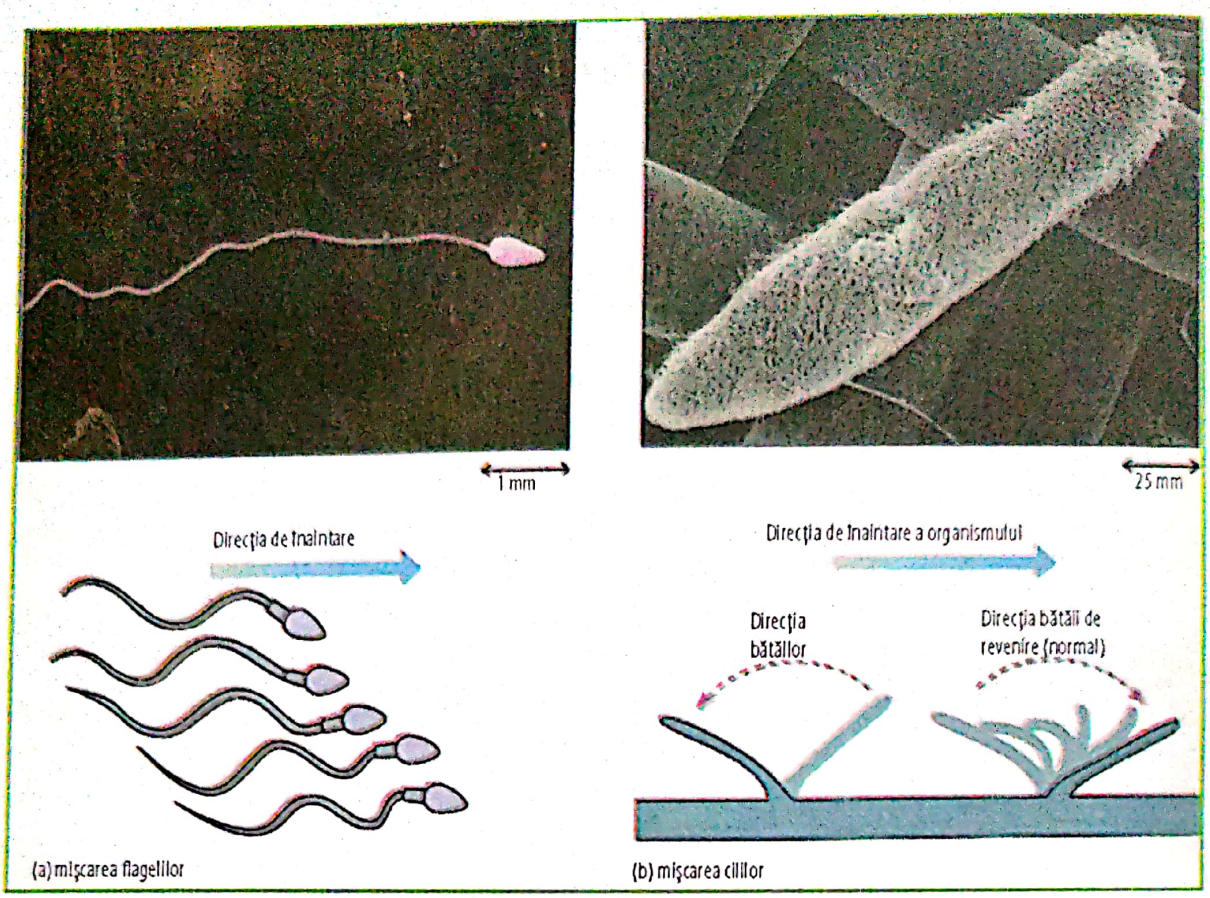


Fig. 18 – Bătăile comparative ale flagelilor și cililor.
a) Flagelii se manifestă, de regulă, prin mișcări ondulatorii și, în felul acesta, celula este antrenată în mișcare pe axul ei de înaintare (ex. înaintarea spermatozoizilor spre ovule); b) La unele protozoare (Paramecium, un animal foarte mobil), cilii imprimă mișcarea prin 40-60 bătăi/secundă în 2 faze (forță + relaxare asemănătoare mișcărilor sportivilor vâslași) (*după W.M. Becker și colab., citați de Campbell, 2000*)

1.1.11. Membrana celulelor la plante

Pereții celulelor, mai ales la plante, sunt un fel de zid care înconjoară celula, dar în același timp un model, un semnal prin care plantele se diferențiază de animale. Membranele celulare la plante se află în formă solidă, protejează celula și împiedică preluarea apei în exces.

Plantele pluricelulare, în întregimea lor, se susțin în poziție erectă tocmai datorită pereților solizi și specializați. Grosimea acestor pereți este de minimum 0,1-7 până la mai mulți µm, adică sunt cu mult mai groase decât membranele plasmatice. Compoziția chimică a acestora este diferită de la o specie la alta și chiar între tipurile de celule care alcătuiesc diferitele organe ale aceleiași plante.

Materialul de bază rămâne practic același (fig. 19), adică celuloza.

Microfibrilele celulozice sunt însă înglobate într-un matrix format dintr-un complex alcătuit de alte polizaharide și proteine. Principiul de construcție este grob, asimilat cu un perete din fier beton sau material alcătuit din fibre de sticlă.

O celulă tânără la plante formează mai întâi un perete celular primar flexibil (fig. 20). Între peretele celular primar și pereții celulari ai celulelor învecinate se află o

Scanned with OKEN Scanner

lamelă mediană formată dintr-un strat subțire, dar bogat în polizaharide din grupa pectinelor. Lamelele mediane mențin legate celulele între ele (să nu uităm că pectinele sunt substanțele care mențin marmelada în forma ei solidă).

Odată cu creșterea și maturizarea celulelor, peretele celular se întărește. Anumite celule înmagazinează suplimentar substanțe de întărire în peretele celular primar, altele formează între membrana plasmatică și peretele primar un alt perete celular secundar. Acest perete secundar este adesea format din mai multe straturi lamelare și are un matrix foarte rezistent și puternic, care oferă protecție și sprijin celulelor. Lemnul, de exemplu, este alcătuit predominant din pereți celulari secundari.

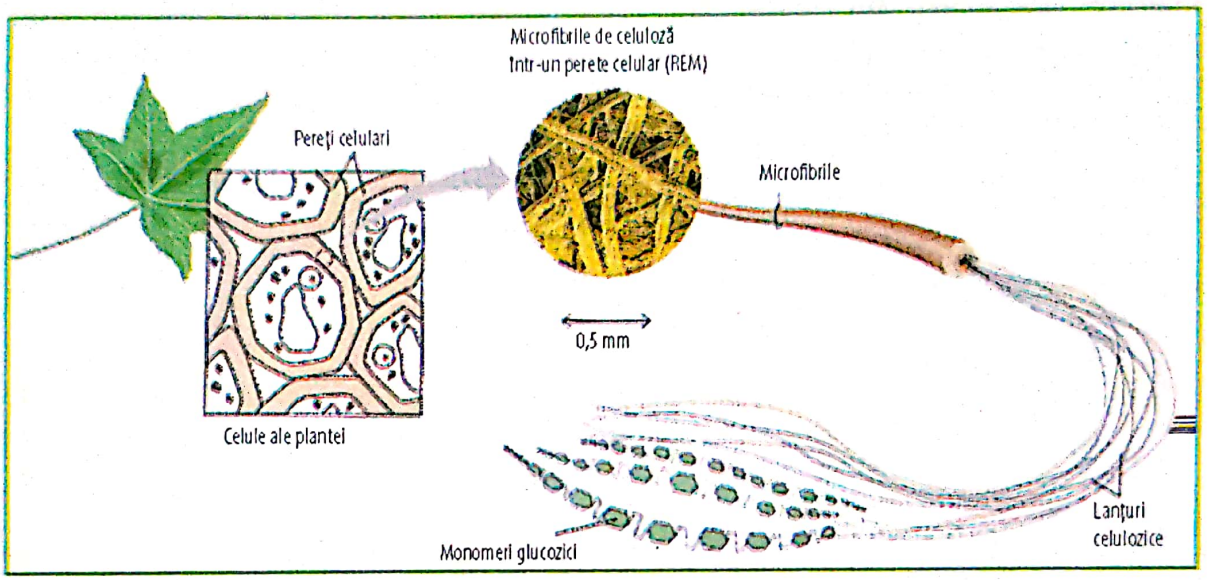


Fig. 19 – Celuloză și pereții celulelor plantelor.
Celuloza este indubitabil un polizaharid. Moleculele paralele de celuloză (linii punctate) sunt susținute de punți de hidrogen de ambele părți ale grupelor hidroxi prezente. Circa 80 molecule de celuloză se asociază pentru a forma o microfibrilă, cea mai importantă unitate de construcție a celulelor plantei (*după Campbell A.N., 2000*)

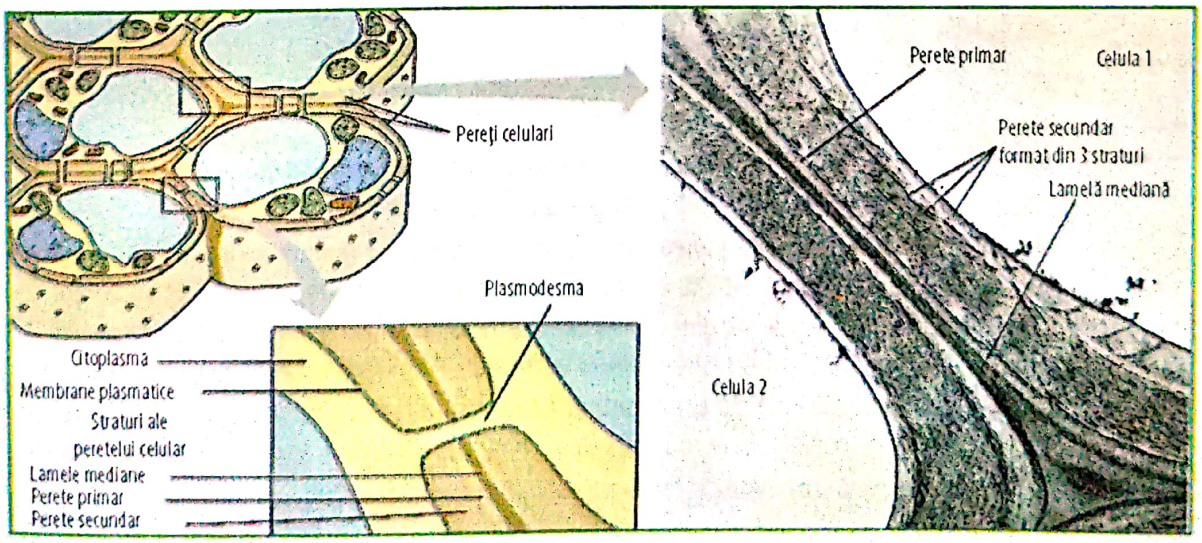


Fig. 20 – Pereții celulelor tinere la plante.
Celulele tinere își construiesc la început un perete primar și apoi, după definitivarea creșterii se dezvoltă în partea interioară un perete secundar foarte puternic. Comunicarea dintre celule se face prin plasmodesme (*după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

1.1.12. Matrixul extracelular la animale

Cele mai multe animale pluricelulare nu posedă un perete care să înconjoare celula, aşa cum am văzut la plante.

Ele dispun însă de un matrix extracelular foarte dezvoltat, format cu precădere din glicoproteine extrase din celulă (să ne reamintim că glicoproteinele sunt proteine cu lanţuri de zaharuri legate covalent).

Cea mai prezentă glicoproteină în matrixul extracelular la cele mai numeroase animale este colagenul. El formează cele mai puternice fibre. În organismul uman, matrixul este format din colagen în procent de circa 50%. Fibrele de colagen sunt înmagazinate într-o împletitură de proteoglicone (fig. 21).

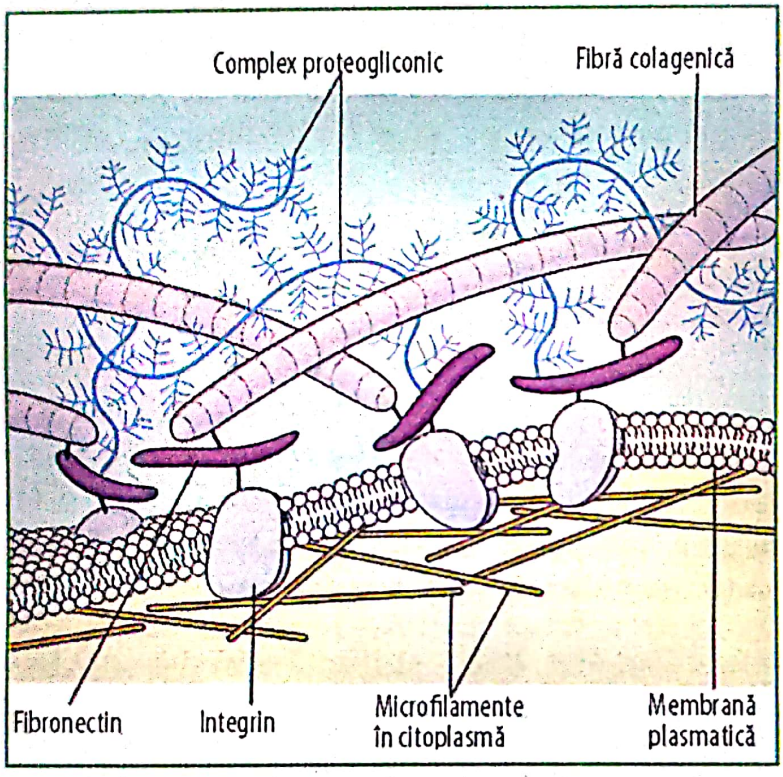


Fig. 21 – Matrixul extracelular la unele animale.
Compoziţia moleculară şi construcţia extracelulară a matrixului este diferită pentru multiplele tipuri de celule. În figură se observă participarea a 3 macromolecule diferite. Fibrele de colagen sunt integrate într-o ţesătură proteogliconică care conţine până la 95% polimeri zaharaţi. În complexul proteogliconic, unităţile proteogliconice sunt dispuse sub forma unor ramificaţii laterale, dispuse pe un fel de frânghie (funie) formată din acid hialuronic. Glicoproteina fibronectin este o proteină adezivă care leagă matrixul extracelular de membrana plasmatică a celulei. Proteinele transmembranice din familia **integrinelor** sunt în contact, pe de o parte, cu matrixul extracelular, iar cu cealaltă parte cu citoscheletul. Prin această cuplare se realizează principalele legături dintre celulă şi exteriorul ei (*prelucrat după Campbell A.N., 2000*)

Alte **glicoproteine** servesc la legătura dintre matrix şi celulă. Este vorba aici de fibronectine care se leagă de integrine, aşa-numitele molecule receptor, integrate în membrana plasmatică. Integrinele străpung deci membrana plasmatică şi la partea lor interioară se cuplează de filamentele citoscheletului. Integrinele sunt în consecinţă

Scanned with OKEN Scanner

un model structural şi funcţional de legătură între matrixul extracelular şi citoschelet. Matrixul extracelular nu serveşte însă numai la susţinerea şi ancorarea celulelor, ci, concomitent, el participă la comportamentul ei dinamic.

În faza de dezvoltare embrionară, anumite celule se deplasează de-a lungul unor căi cunoscute, prin care microfilamentele, în funcţie de „densitatea reţelei" fibrelor, sunt orientate spre matrixul extracelular, dar în egală măsură şi coordonarea activităţii genelor în nucleul celulei, adică conduc la producţia specifică de ARN-mesager. Este foarte posibil, de asemenea, ca integrinele să transfere impulsuri mecanice de la matrixul extracelular către citoschelet, iar acesta induce la rândul său semnalul producţiei anumitor substanţe chimice. Acestea, la rândul lor, transferă informaţia către celule.

În acest moment există însă numeroase funcţii ale matrixului extracelular încă neclarificate referitoare la viaţa extracelulară a celulei. Cercetătorii se află de abia la început în acest domeniu, dar cercetările avansează repede. Legăturile între diferite celule ale animalelor sunt prezentate în figura 22a.

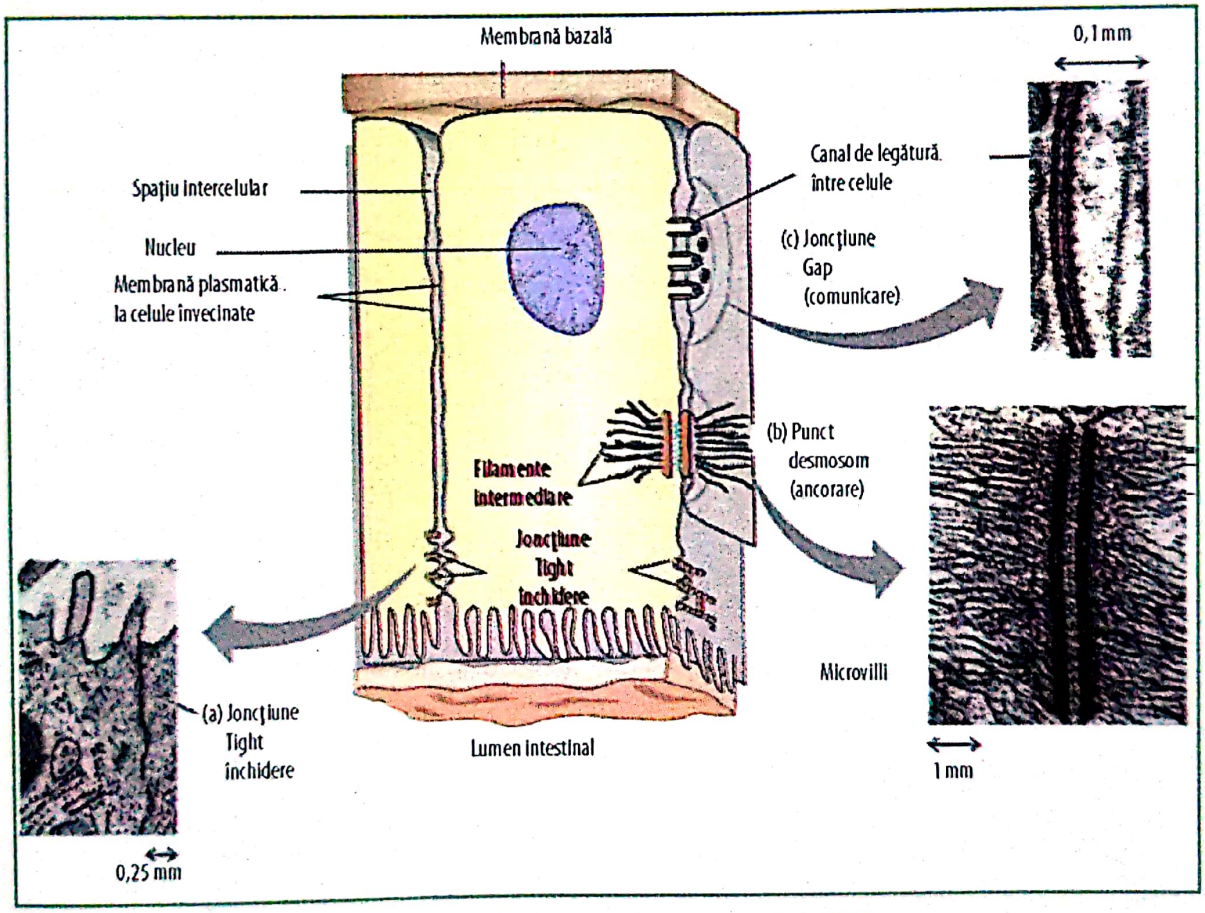


Fig. 22a – Legături intercelulare la animale (*prelucrat după Campbell A.Neil, 2000*)

Modelul acesta de legături se găseşte cu prioritate în ţesuturile epiteliale (adică cele care formează pielea la exterior şi anumite membrane organice la interior). Desenul de mai sus se referă la legătura dintre celulele membranei intestinale, şi sunt în fapt prezentate 3 tipuri de legături a căror structură se corelează foarte bine cu funcţiunile pe care le îndeplinesc. Alăturat lor mai există şi alte structuri de contact, reprezentate în figură, cum ar fi, de exemplu, hemidesmosomii, de care de fapt se leagă celulele epiteliale, şi anume:

Scanned with OKEN Scanner

a) **Joncțiunea Tight** (contact de închidere). Aceste legături formează un fel de suturi (cusături) în formă de centuri de jur împrejurul celulei. Pe aceste contacte de închidere se așază o porțiune a membranei celulei vecine, și este locul unde se realizează un contact real, vizibil nu numai pe desen, dar și pe fotografia electronică (TEM). Pentru a se evita o închidere totală, lichidul celular, prin intermediul unui strat al celulelor epiteliene, se strecoară înăuntru (un fel de picurare). Acest contact de închidere (un fel de robinet) al celulelor epiteliului intestinal separă, spre exemplu, conținutul intestinal de restul lichidului corporal (TEM).

b) **Punctele desmosomice** (desmosomi – de la grecescul *desneo* = legătură și *soma* = corp). Aceste legături acționează ca niște nituri și unesc celulele de stratul epitelial stabil. Ancorate de desmosomi sunt fibrele de keratină. Keratina este constituită din filamente proteice intermediare extrem de rezistente (TEM).

c) **Joncțiunea Gap** (contacte de comunicație). Reprezintă, de fapt, un sistem de canale citoplasmatice între celulele învecinate. În fond, este vorba aici de o proteină extrem de poroasă, denumită conexină și care permite trecerea sărurilor, zaharurilor, aminoacizilor și a altor molecule de dimensiuni mici (TEM). Un detaliu privind joncțiunea Gap este prezentat în figura 22 b.

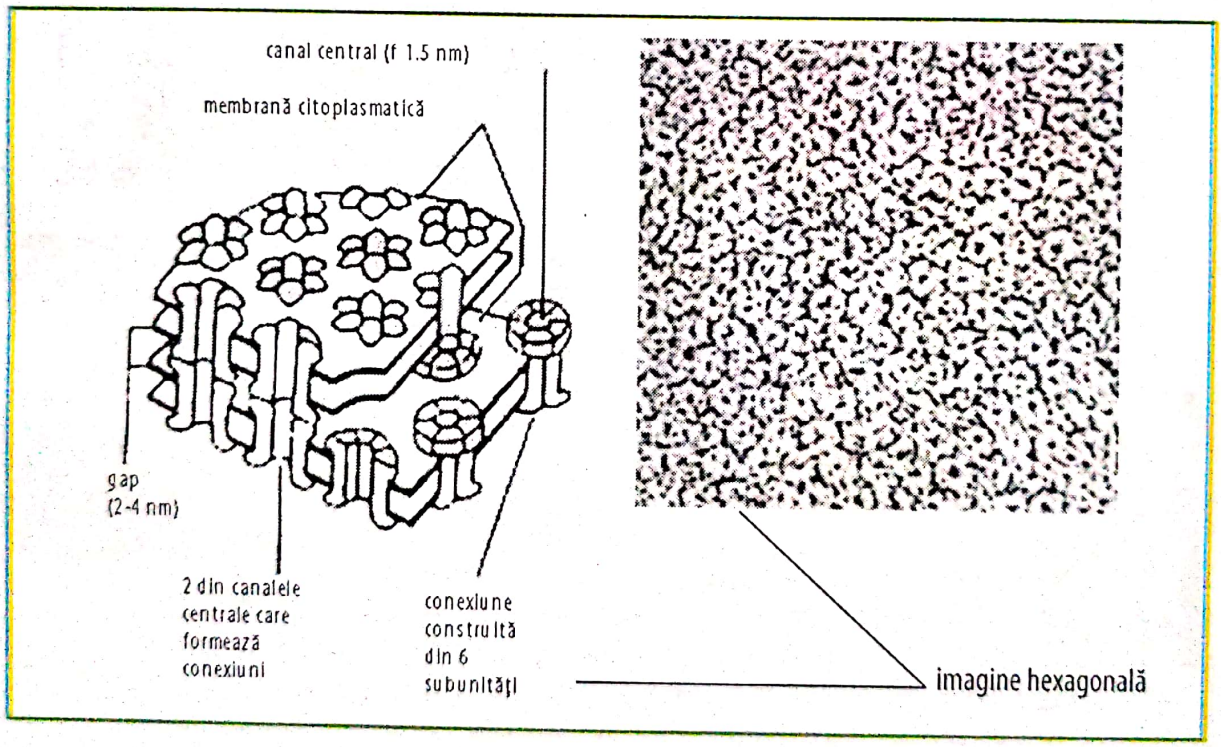


Fig. 22 b – Model de construcție al unei joncțiuni GAP pornind de la o fotografie electronică și o analiză structurală Röntgen (*Lexigon der Biologie*)

În țesuturile musculare ale inimii, curentul de ioni care se mișcă în felul acesta coordonează contracția celulelor. Foarte dezvoltate sunt contactele de comunicare în embrionii animalelor unde transferul chimic al informațiilor între celule în scopul dezvoltării lor este absolut necesar.

Scanned with OKEN Scanner

Firește că funcțiile celulelor, ale componentelor lor (organite), ale întregului sistem constructiv sunt mult mai complexe, unele dintre ele sunt cunoscute, altele mai puțin cunoscute. Cercetarea este în plină desfășurare în acest sens, iar rezultatele obținute în fiecare zi sunt fantastice.

În afara membranei celulare pe care am prezentat-o mai sus există o serie de membrane care delimitează organitele celulei sau conținutul citoplasmatic, atât construcția cât și funcțiunile lor sunt în detaliu prezentate în lucrarea lui Campbell A. Neil intitulată *„Biologie"* sau în lucrarea unui alt grup de autori americani intitulată „Biologie celulară" (Lodish și colab., 2001).

Conceptele cheie care stau la baza structurii și funcționării lor sunt următoarele:

- Noile cercetări arată că modelele membranoase sunt tot mai numeroase, poate infinit de numeroase, demonstrând diversitatea lumii vii.
- Biomembranele, constructiv reprezintă un mozaic lichid format din lipide, proteine și hidrați de carbon. Aceasta înseamnă că membranele nu sunt deloc straturi de substanțe care nu se mișcă ci, dimpotrivă (observați vă rog mișcarea unei amoebe). Mișcarea „flip-flop" determinată de schimbul prin membrane, îndeosebi a unor componente hidrofile. Cuvântul mozaic este dat de un număr mare de proteine (o membrană este ca un covor pestriț) înglobate într-un strat dublu de lipide (vezi fig. 23). Acest dublu strat lipidic reprezentând materialul constructiv de bază al membranelor. Funcțiunile de bază sunt însă apanajul proteinelor, chiar dacă cantitativ se găsesc în valori mai mici.

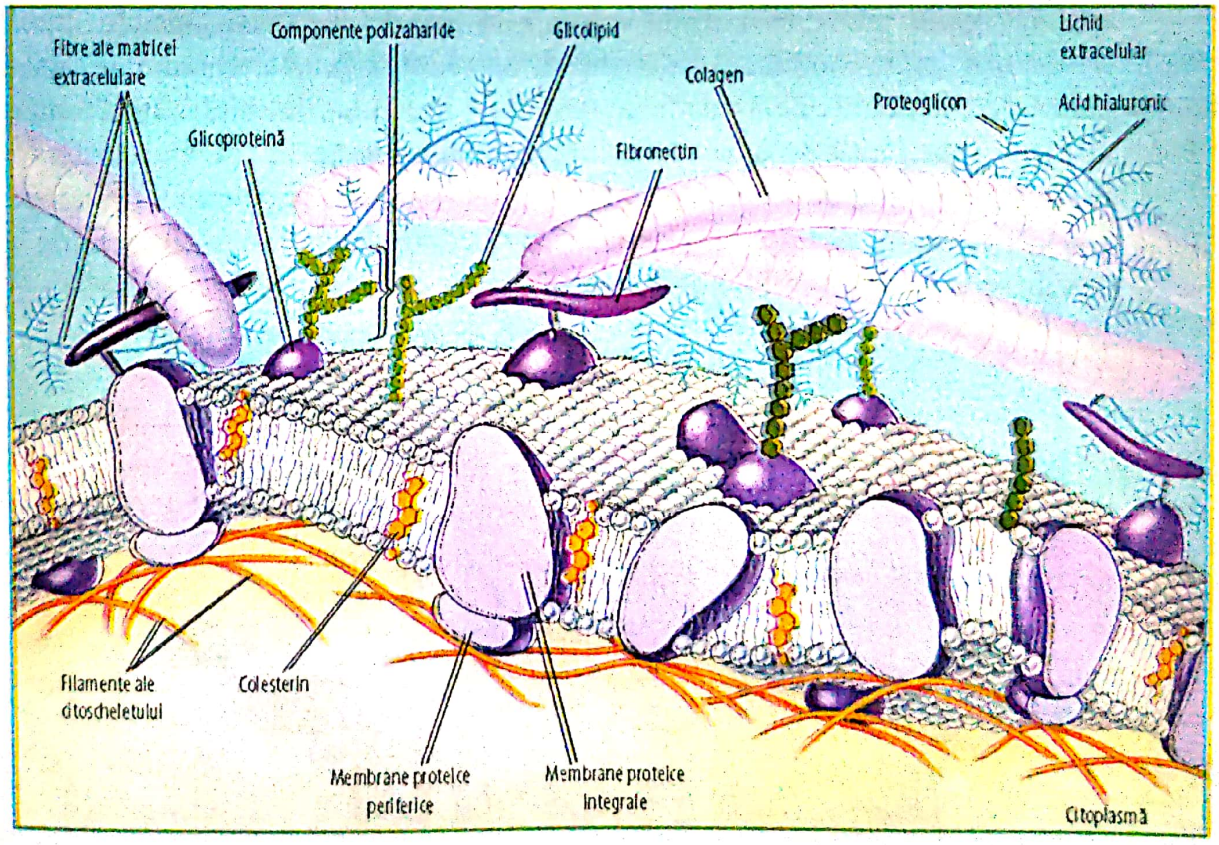


Fig. 23 – Structura membranei plasmatice a unei celule integrale de origine animală (văzută în secțiune) (*Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

Funcţiile acestor membrane sunt extrem de diferite şi, fără a intra în detaliu, ne permitem a enumera câteva dintre ele:

- Transport de proteine, fie prin canale hidrofile, fie cu ajutorul ATP hidrolizat.
- Producerea şi activarea unor enzime. Organizate ca şi complexe multienzimatice, acestea catalizează în diferite etape schimbul de substanţe.
- Receptor de proteine. Proteinele acumulate pot constitui şi sediul, locul unde pot fi legaţi diferiţi hormoni şi alte substanţe transportoare.
- Legături între celule, conform procedeelor şi contactelor prezentate mai sus.
- Recunoaşterea celulă-celulă. Se face prin intermediul unor glicoproteine. Glicoproteinele (proteine cu lanţ scurt hidrocarbonat) servesc ca structuri de recunoaştere şi de comunicare cu alte celule.
- Cuplarea de citoschelet şi de matrixul extracelular, aşa cum s-a arătat anterior. Se face astfel schimbul de informaţii şi substanţe între celule şi exteriorul lor.
- Construcţia moleculară a unei biomembrane conduce la o permeabilitate selectivă. Este vorba atât de permeabilitatea unor substanţe grase (lipide) cât şi de transportul proteinelor. Aici întâlnim următoarele situaţii:
  - transport pasiv prin difuziune a moleculelor prin membrane (lipide, proteine etc.)
  - osmoza, transport pasiv al apei moleculare, foarte necesară activităţii celulei.
- Supravieţuirea celulei este corelată de un bilanţ echilibrat al apei. Bilanţul apei în celule este diferit de la animale la plante. Pierderea apei în cazul celulelor animale conduce la reducerea dimensiunilor la celulele animale sau la plasmoliză la plante. Fenomenul se manifestă în aşa-zisele soluţii hipertonice în care concentraţia soluţiei mediului este mai mare decât cea din celule. În varianta unei soluţii izotonice întâlnim o stare de normalizare şi relaxare a celulelor, iar în cazul unei soluţii hipotonice, tendinţa apei este aceea de a pătrunde în celule, numită liză la animale şi turgescenţă la plante (fig. 24).

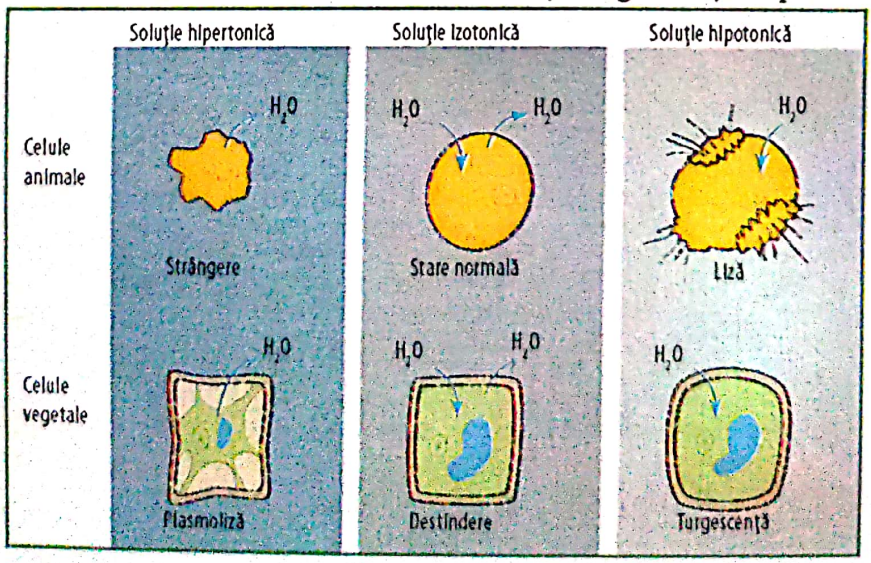


Fig. 24 – Echilibrul apei în celulele vii (*după Campbell şi colab., 2003*)

– Proteine specifice uşurează transportul pasiv al unor substanţe solubilizate, dar selectate. Anumite enzime pot stimula sau inhiba acest proces. Enzimele nu realizează deloc sinteze sau modificări chimice, ele doar accelerează procesul fizic de difuziune, nerealizabil în absenţa lor.

– **Transportul activ**, spre deosebire de cel pasiv, funcţionează ca o pompă a substanţelor dizolvate, contrar stării lor de concentraţie. Transportul, în acest caz, se face prin canalele specializate despre care am vorbit mai sus şi are loc într-o singură direcţie. Pompa sodiu-potasiu este tipică pentru transporturi active.

– Un alt model de transport activ se realizează prin aşa-numitele pompe ionice care realizează la nivelul membranelor un potenţial electric. Tensiunea electrică ce se realizează la nivelul membranei este denumită şi „potenţial membranic" şi se situează între 50 şi 200 milivolţi. Asta înseamnă că lichidul extracelular este încărcat cu ioni pozitivi, iar cel citoplasmatic cu ioni negativi. Deplasarea se face din celulă către exterior şi este favorizată de ATP.

– Poate avea loc şi un **cotransport**, adică un transport cuplat realizat prin legarea la proteina membranică a unei alte substanţe solubile, cuplul traversând membrana printr-unul din procedeele prezentate mai sus.

– Macromoleculele pot să traverseze membrana plasmidică prin **exocitoză** şi **endocitoză**. Prin exocitoză se realizează eliberarea macromoleculelor, de regulă prin intermediul unei vezicule care se topeşte împreună cu membrana plasmatică. Endocitozele sunt cu mult mai importante şi presupun înglobarea macromoleculelor sau a altor secvenţe organice tot cu ajutorul veziculelor care se formează la suprafaţa membranelor. Exocitoza este specifică eliminării unor hormoni şi enzime (insulina, de exemplu, cu mare rol în reglarea unor procese biochimice în afara celulelor).

În cazul endocitozelor întâlnim 3 situaţii:

– **Fagocitoză** - preluarea şi prelucrarea materialului particular, bacterie, virus etc.

– **Pinocitoză** - absorbţia picăturilor din lichidul extracelular, cu formarea unor vezicule cu mult mai mici.

– **Endocitoză cu receptor închiriat** - se folosesc receptori proteici cu structuri specifice de recunoaştere. Substanţele exterioare preluate prin aceşti receptori se numesc **legande**.

Endocitozele sunt procese extrem de importante care, aşa cum se va vedea în această lucrare, pot servi, prin coordonare genetică, la elaborarea unor procedee de combatere a unor bacterii şi virusuri dăunătoare organismelor utile. În acest caz, fagocitozele sunt de preferat.

– Membrane proteice specializate pot transmite şi transfera semnale exterioare către interiorul celulei. În acest scop, receptorii membranelor creează iniţial **substanţe mesagere primare** care apoi prin intermediul unor proteine ce transportă mesajul şi stimulează apariţia unei enzime se va ajunge la activarea unui mesager secundar, care nu este altceva decât o moleculă citoplasmatică ce declanşează noile modificări necesare a avea loc în celulă.

Scanned with OKEN Scanner

Toate principiile şi explicaţiile prezentate mai sus îşi au rostul lor în înţelegerea fenomenelor ce stau la baza unor importante tehnologii prin care modificările activităţilor celulare dirijate genetic pot conduce la modificarea comportamentului ţesuturilor, organelor şi aceasta pentru că:

REŢINEŢI!

Celula ca un întreg, ca o entitate vie, reprezintă cu mult mai mult decât suma componentelor din care este alcătuită. Acest lucru este valabil şi pentru **organe şi organisme.**

Revenind la celulă, forma primară şi completă a vieţii, trebuie să gândim şi să recunoaştem că nici o organită celulară nu lucrează pentru ea însăşi. Un exemplu privind unitatea întregului o reprezintă şi fotografia microscopică prezentată în figura 25.

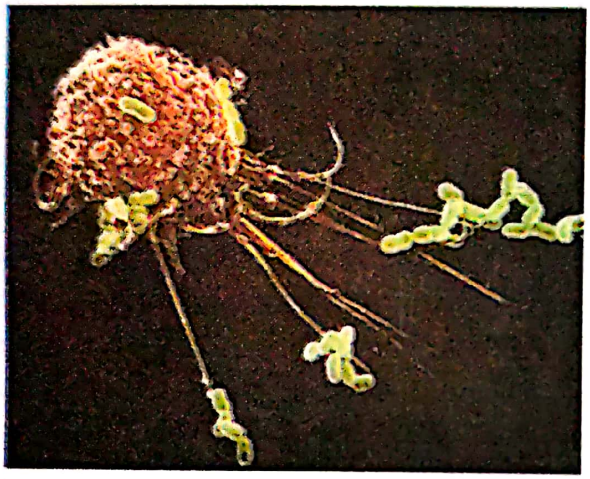


Fig. 25 – Dezvoltarea funcţiilor celulei prin colaborarea mai multor organite celulare. Se observă capacitatea acestui macrofag (orange) de a recunoaşte celulele bacteriene (verde), de a le ataca şi distruge, o acţiune coordonată a întregii celule. Structurile care coparticipă la această fagocitoză sunt: citoscheletul, lizozomii şi membranele plasmatice. Alte funcţii ale celulelor sunt rezultatul unor însuşiri emergente, aparţinând schimburilor active ale anumitor părţi celulare (*prelucrare după Campbell A. Neil, 2000*)

În esenţă, „marea celulă" este un macrofag. Ea participă permanent la protecţia organismului împotriva infecţiilor prin preluarea şi distrugerea bacteriilor (mici şi verzi în foto). Macrofagul dispune de anumite dispozitive care permit formarea anumitor prelungiri, filamente, care agaţă pur şi simplu bacteriile. La aceste acţiuni participă actinfilamente împreună cu alte părţi ale citoscheletului.

După ce bacteria a fost prinsă, ea este distrusă de macrofag cu ajutorul lizozomilor formaţi din sistemul membranos creat de R.E. şi aparatul Golgi. Enzimele de digestie din lizozomi şi proteinele citoscheletului sunt produse fără excepţie de ribozomi, iar sinteza lor **este programată prin informaţia genetică, provenită din ADN-ul prezent în nucleu.** Toate aceste procese şi procedee au nevoie de energie, şi aceasta este livrată de mitocondrii sub formă de ATP. Aşadar, funcţiile celulelor se dezvoltă din **ordinea lor structurală**, o ordine nemaiîntâlnită în alte sisteme decât cele vii.

Scanned with OKEN Scanner

Cunoașterea biologiei celulare, adică a activității celulelor, este coordonată, așa cum am văzut, de către propria ei informație genetică, prezentă la fel în absolut toate celulele organismului, fiind de mare importanță în elaborarea noilor biotehnologii celulare și moleculare care vor fi prezentate parțial în acest material și care au condus la realizări deja incredibile. Să nu uităm că o singură celulă are tot ce îi trebuie pentru a reface un organism, iar prin modificările care i se pot aduce poate reface o diversitate de organisme. Acest lucru devine foarte important numai în cazul unor calamități care pun în pericol viața planetei. ■

1.2. ÎNMULȚIREA CELULELOR. GENOMUL

Viața aduce viață, viața creează viață. Capacitatea lumii vii de a se înmulți este un FENOMEN. Este modul foarte vizibil prin care lumea vie se deosebește de materia minerală. Încă în 1855, medicul german Rudolf Virchow spunea astfel: *„Acolo unde există o celulă, trebuie neapărat să fi fost anterior o altă celulă, la fel cum existența unui animal trebuie să fi fost determinată de un alt animal, iar o plantă provine neapărat dintr-o altă plantă”*. Și, în concluzie, omul de știință spunea: *„Omnis cellula e cellula”*, adică *„fiecare celulă provine dintr-o altă celulă”*. Continuitatea vieții este asigurată deci de înmulțirea celulelor, adică mai exact de diviziunea celulelor. În procesul de diviziune celulară, separarea materialului genetic este prezentată în mod spectaculos în fotografia microscopică fluorescentă din figura 26.

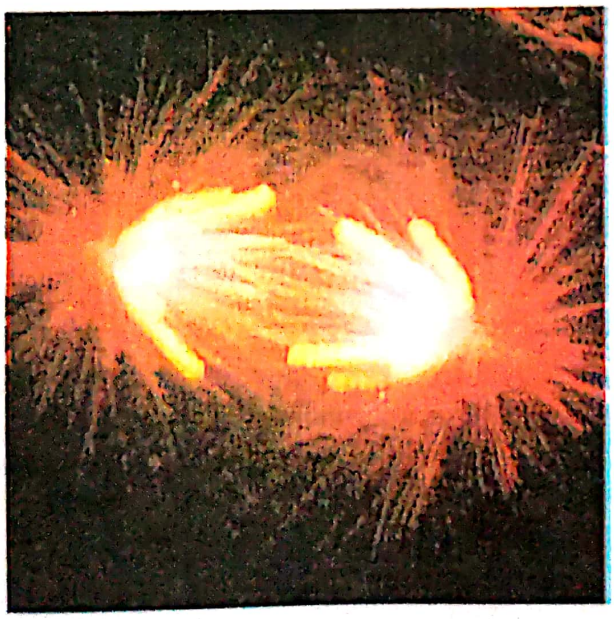


Fig. 26 – Separarea materialelor genetice prin aparatul Spindel în procesul de diviziune a celulei (*prelucrare după Campbell A. Neil, 2002*)

Noțiunile de înmulțire și reproducție sunt foarte adesea folosite sinonim, au același înțeles. Cu toate acestea, trebuie să semnalăm faptul că reproducerea nu conduce întotdeauna și la înmulțire. Ea include meioza care produce și un material genetic de altă natură.

Legat de înmulțirea celulelor vom prezenta în continuare câteva concepte cheie care ne vor fi utile în deslușirea tainelor biotehnologiilor genetice.

Scanned with OKEN Scanner

1) Diviziunea celulară constituie acel act biologic prin care organismele se înmulțesc, cresc și se însănătoșesc

Prin diviziunea în două a unei celule apar cu siguranță două noi ființe vii. Acest lucru este însă valabil pentru formele simple de viață, cum sunt amoebele la care diviziunea conduce la obținerea a două celule absolut identice (fig. 27a).

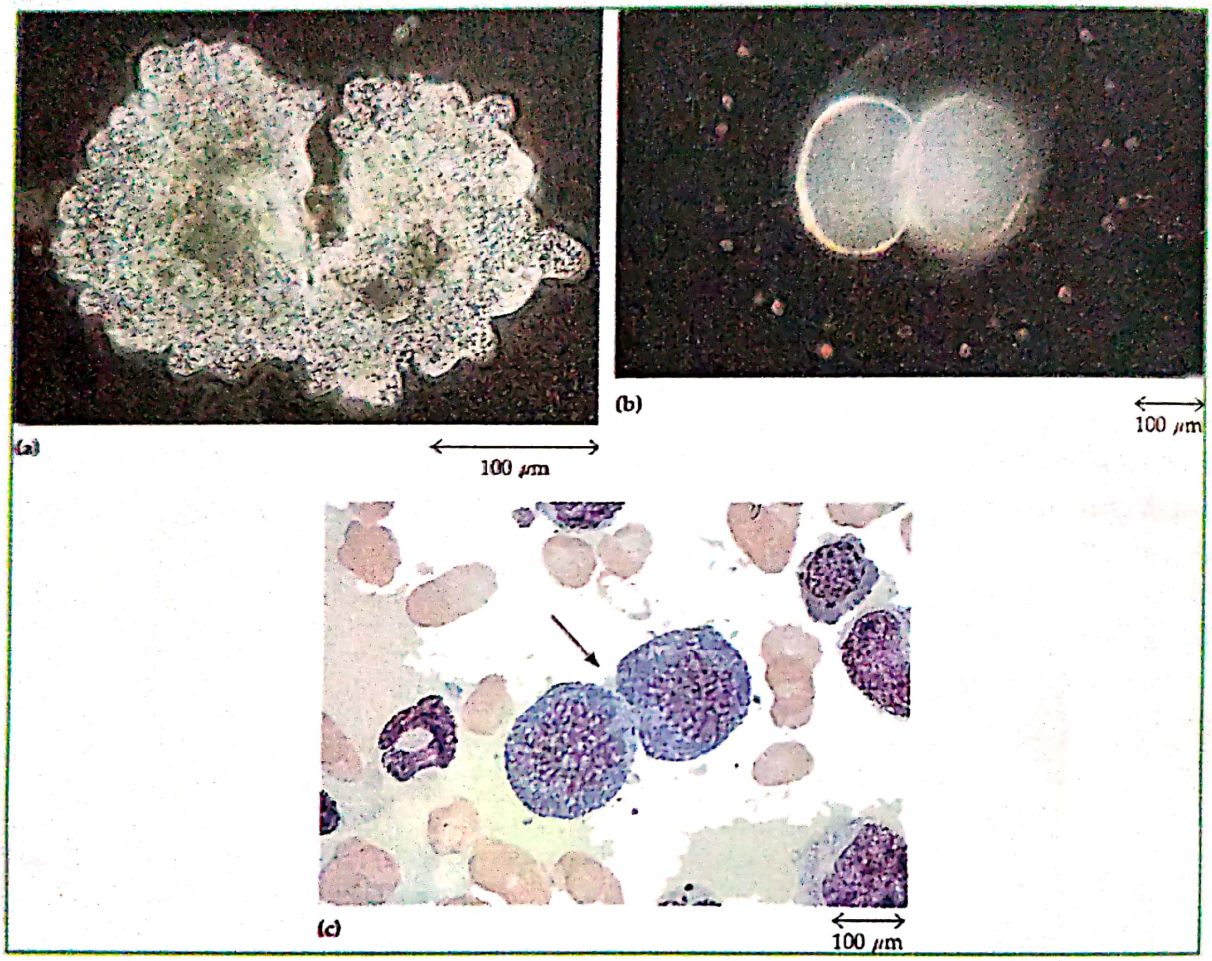


Fig. 27 – Diviziunea celulară - sarcini și funcțiuni
a) Amoeba este un eucariot monocelular care se înmulțește prin diviziune în două, fiecare nouă celulă devenind un organism de sine stătător. Înmulțirea se face fără existența unor organe sexuale.
b) La animalele pluricelulare, diviziunea celulelor reprezintă premisa pentru creșterea și dezvoltarea embrionilor. Această fotografie pe fond negru indică, de fapt, embrionul unui arici de mare imediat după fecundarea celulelor sexuale. S-a surprins chiar prima diviziune.
c) Chiar și în organismele adulte, diviziunea celulară servește la înlocuirea și repararea unor țesuturi. Celulele din măduvă prin înmulțire completează celulele sângelui.
(Lodish și colab., 1996; Campbell A. Neil, 2002)

Fenomenul în sine conduce la înmulțirea populațiilor, dar și la repararea unor celule avariate cu funcții incomplete și deci neperformante. Natura are grijă să creeze numai organisme performante.

Cele neperformante sunt eliminate prin fenomenele de endocitază prezentate anterior. Acest lucru este valabil și pentru numeroase țesuturi umane.

Scanned with OKEN Scanner

În măduva umană, celulele roşii se reproduc constant prin diviziune pentru a înlocui celule bătrâne sau uzate din sânge. Acestea sunt scoase din „sistem" şi înlocuite prin fagocitoză.

Atât la om cât şi la alte animale şi plante, apariţia şi dezvoltarea unui nou organism pleacă de la fecundarea celulelor sexuale şi diviziunea lor continuă până la apariţia organismului în întregimea sa.

Celula reprezintă totuşi un edificiu foarte complicat, care nu se poate înmulţi aşa, pur şi simplu, prin divizare în două, cum se întâmplă cu un balon de săpun. În cazul celulei, dotată cu un material genetic extrem de complicat, dar care imprimă acestora însuşiri specifice, dar simetrice, ambele celule care rezultă trebuie să primească o cantitate egală de molecule de ADN.

DEFINIŢIE

Dotarea cu moştenirea genetică existentă în ADN-ul unei celule este denumită GENOM

Genomul este format din una sau mai multe molecule de ADN, uneori foarte lungi. Pe aceste celule sau în interiorul lor (bucăţi din ele), sunt dispuse sute sau mii de gene, denumite şi unităţi de moştenire sau unităţi ereditare, ale căror însuşiri, proprietăţi, determină existenţa şi felul vieţii. La eucariote, moleculele de ADN sunt strâns ghemuite şi înfăşurate pe **histone**. Din acestea (din aceste suluri) apar **cromozomi** numai cu puţină vreme sau şi în timpul diviziunii, când, de fapt, se pot vedea, se pot recunoaşte în lumina microscopului.

Rezultatul este acela că, prin diviziune, valoarea originală a genomului este transmisă mai departe generaţiilor următoare fără a fi cu ceva diminuată. Aici este cazul să spunem, aşa cum de fapt se va vedea, că această valoare genetică prin tehnicile genetice de astăzi poate fi modificată în bine sau în rău, dar numai dacă are loc o intervenţie antropică şi extrem de rar se întâmplă acest lucru în mod natural.

De aceea, o celulă pregătită pentru înmulţire, îşi copiază toate genele şi le ordonează sistematic şi simetric la polul opus al celulei şi se distribuie în felul acesta uniform în celula fiică. Întrucâtva, lucrurile sunt asemănătoare atât la eucariote cât şi la procariote. ■

1.2.1. Diviziunea la procariote

Reprezentantul de bază al acestora în mediul viu îl constituie bacteriile. Cunoaşterea fenomenului de înmulţire la bacterii este cu atât mai important cu cât se ştie că ele constituie un mod eficient de transmitere a mARN către anumite celule ce se vor modificate genetic.

Organisme monocelulare extrem de mici, genomul bacteriilor este format dintr-un singur cromozom pe care se află inserate majoritatea genelor. El este de forma unui cerc şi este format dintr-o moleculă de ADN asociată cu o proteină. Înmulţirea bacteriilor se face prin diviziune simplă (fig. 28).

Scanned with OKEN Scanner

Deşi la prima vedere lucrurile par mai simple ca la eucariote, lucrurile nu stau deloc aşa pentru că şi aici apare necesitatea ordonării şi dublării genomului, copierea şi transferul lui spre cele două celule fiice. Dacă încercăm să desfăşurăm ghemotocul cromozomal, el este la *Escherichia coli* de 500 de ori mai lung decât celula. Firește, un asemenea cromozom trebuie să fie bine împachetat în celulă.

Important este faptul că ceea ce apare prin separarea binară nu este o celulă mamă şi o celulă fiică, adică una bătrână şi una tânără, ci în egală măsură cele două sunt surori. Acest lucru se datorează schimbului şi reacţiilor chimice din perioada diviză-rii, când întreg materialul celulei are aceeaşi vârstă şi compoziţie chimică.

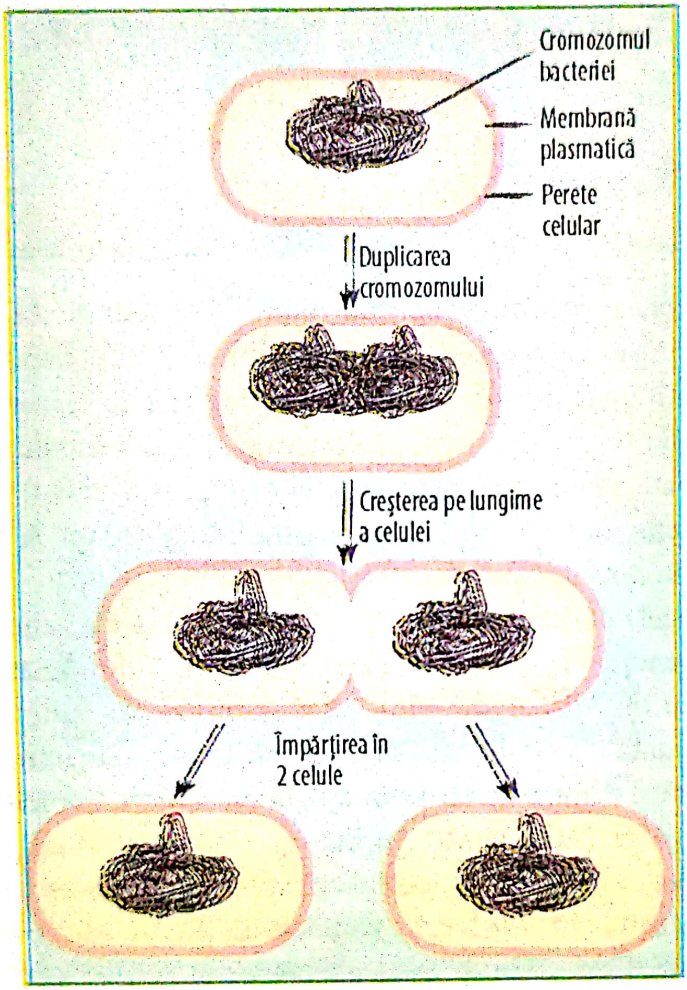


Fig. 28 – Diviziunea celulei la bacterii.
Cromozomii legaţi de membrana plasmatică se dublează - fenomenul se mai numeşte şi **replicarea ADN**. Odată cu creşterea celulei, cromozomii fii se îndepărtează unul de altul. Se unesc apoi fiecare de membrana plasmatică. Prin crearea unei noi membrane celulare rezultă apoi două celule fiice. Înzestrarea lor genetică este identică. Acest procedeu se cunoaşte ca **diviziune simplă** sau **„separare binară"** (*după Campbell A. Neil şi colab., 2003*)

1.2.2. Eucariotele au un genom format din mai mulţi cromozomi

Genomul eucariotelor este cu mult mai mare decât al procariotelor. Cu toate aces-tea, modul de înmulţire respectă regulile de bază, şi anume:

Scanned with OKEN Scanner

- fiecare celulă care are mii de gene trebuie copiată, ca, de altminteri, şi fiecare genă în parte;
- sistemul de divizare, de împărţire, trebuie să ofere fiecărei celule fiice, în modul cel mai ordonat cu putinţă, un genom complet;
- dedublarea şi repartiţia genelor este uşurată de faptul că genele sunt distribuite pe mai mulţi cromozomi (fig. 29).

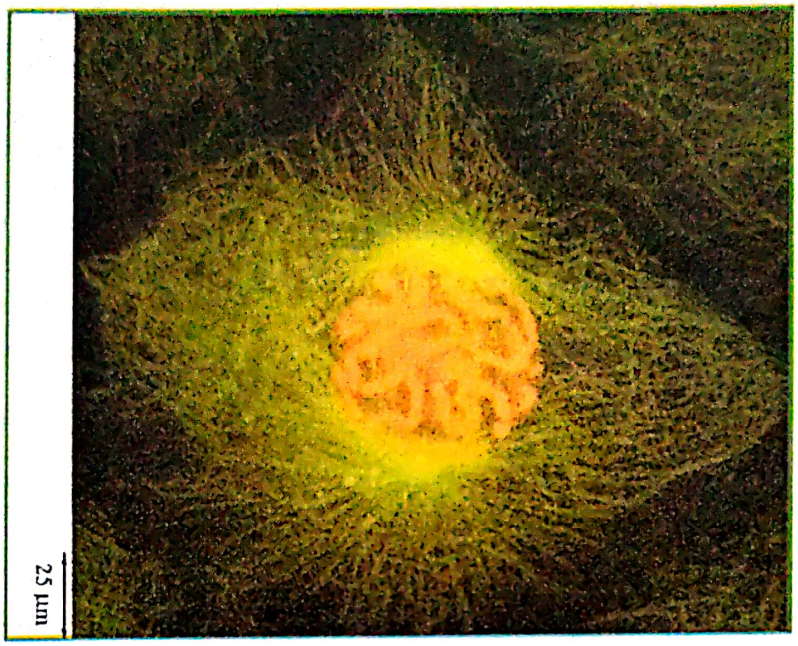


Fig. 29 – Cromozomii la eucariote.
În nucleu cu puţin înainte de diviziune în celulele epiteliale ale unui animal rozător se poate recunoaşte un labirint format din fire cromozomiale (orange). Citoscheletul este colorat în verde. Cromozomii îşi trag numele de la grecescul ***chromos*** care înseamnă „culoare" şi ***soma*** pentru „corp" (*Fotografia a fost făcută la un microscop cu metoda microfluorescentă de către J.M. Murray de la Universitatea Pensylvania Medical School. Fotografia este uşor modificată pentru a fi mai expresivă*)

Fiecare specie de eucariotă dispune în nucleul său de un număr caracteristic de cromozomi, număr de-acum cunoscut pentru majoritatea speciilor. Celulele somatice, adică toate celulele unui organism în afara celor sexuale, adică în afara gameţilor (ovul şi spermatozoizi la om şi alte animale) conţin fiecare cîte 46 cromozomi. Celulele sexuale însă dispun numai de jumătate din numărul de cromozomi, adică 23 în cazul omului. În fiecare cromozom se găseşte o moleculă de ADN sub forma unei funii împletite. Cromozomul conţine mii de gene. ADN-ul este legat cu histonele şi numeroase alte proteine, care menţin verticalitatea şi stabilitatea structurii cromozomale şi îşi aduc o contribuţie foarte importantă la reglarea activităţii genetice.

Acest complex format din ADN şi diverse proteine este denumit **cromatidă** şi este alcătuit din fibre lungi şi subţiri, strâns pliate şi împachetate. Imediat înainte de divizare, celula îşi copiază întregul genom, adică îşi dublează fiecare cromozom. Această dublare este cunoscută în biologia celulară ca **replicare**. Prin replicare se ajunge la apariţia a două cromatine (cromatide) surori. Apar deci 2 copii identice ale moleculei ADN care, înainte de replicare era una singură. Un segment de cromozom, denumit **centromer**

Scanned with OKEN Scanner

menţine o vreme cele două cromatine gemene împreună. În final apare însă un nou proces denumit **mitoză** de-a lungul căruia cromatidele gemene (surori) sunt separate şi distrubuite ca noi cromozomi în cele 2 celule, finalizându-se în felul acesta procesul de diviziune (fig. 30). Pe perioada mitozei are loc concomitent şi **citokineza**, adică procesul prin care şi citoplasma se distribuie uniform celor două celule noi. Şi de unde înainte exista o singură celulă, apar de-acum două, care deţin o înzestrare genetică egală cu cea a celulei de pornire. Acest sistem de înmulţire, aşa cum am arătat deja, are rolul lui în formarea de miliarde şi miliarde de celule în toate organele corpului, care le înlocuiesc pe cele îmbătrânite sau le repară pe cele afectate.

În cazul gameţilor lucrurile se întâmplă altfel. Procesul în sine se numeşte **meioză** Celulele de origine vin din zone diferite sau aparţinând unor indivizi diferiţi şi conţin numai jumătăţi din cromozomi. La om, numărul de cromozomi în celulele primare este de 23, iar meioza mai este denumită şi **diviziune reductibilă**. Prin combinarea celulelor sexuale se ajunge la numărul specific speciei (46 cromozomi la om) şi rămâne constant pe tot parcursul mitozei pentru toate celulele somatice. Despre meioză vom vorbi într-un capitol separat.

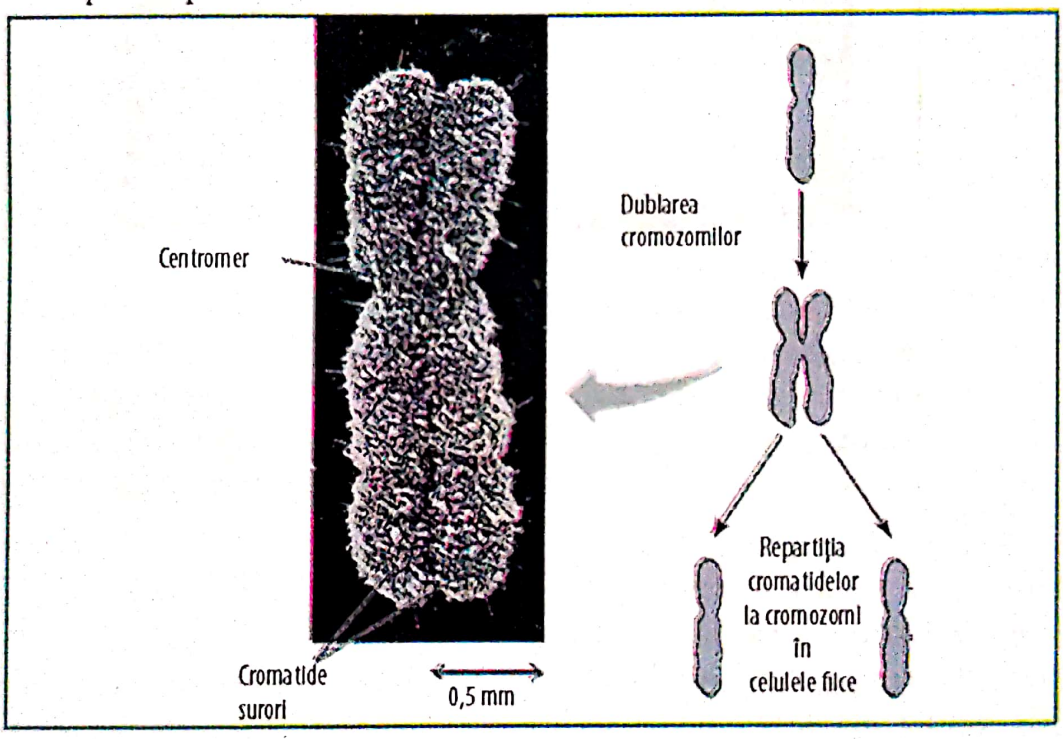


Fig. 30 – Dublarea şi distribuţia comozomilor în mitoză.
Înainte de divizarea celulei se dublează cromozomii. Se pleacă deci de la un cromozom: dublarea (replicarea) cromozomilor porneşte de la 2 cromatide surori legate împreună de centromer. Fotografia electronică din stânga arată un cromozom uman în această fază. Cromozomul, în mod normal, nu este vizibil. El se va forma din fibre foarte lungi de cromatidă, iar apoi va fi pliat şi bine împachetat. Fibrele de cromatidă sunt formate de molecule ADN, lungi de mai mulţi cm, asociate cu diferite proteine. Moleculele ADN ale cromatidelor surori au o compoziţie identică cu a celulei mamă pentru că provin prin dedublarea aceluiaşi material genetic. În continuare, de-a lungul mitozei, cromatidele surori se separă mecanic şi formează noii cromozomi care vor fi repartizaţi celulelor noi, surori (*prelucrare după Campbell A. Neil, 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

1.2.3. Ciclul celular. Mitoza alternează cu diferite faze intermediare

Pentru numeroase etape anterioare mitozei, este responsabil **fusul mitotic** sau **fusul de diviziune**, aşa cum se va vedea mai departe. Deocamdată trebuie să reţinem că mitoza în sine reprezintă numai o parte dintr-un **ciclu de viaţă extrem de complex al celulei** (fig. 31).

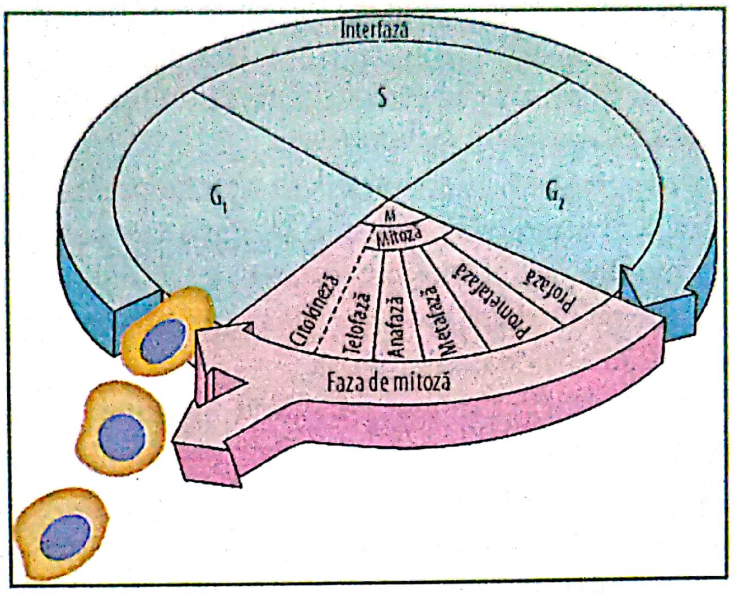


Fig. 31 – Ciclul celular.
Înaintea fazei mitotice (M), celula trece printr-o perioadă de maturare denumită interfază. Prima parte a interfazei se notează cu G_1 şi, aşa cum se vede şi din figura 32, reprezintă momentul începerii sintezei ADN pentru următoarele procese din faza S care înseamnă, de fapt, sinteza deplină a ADN. Faza G_2 începe după sinteza ADN şi constă în realizarea numărului dublu de cromozomi de care are nevoie mitoza adică 4n. La organisme diploide, faza G_2, se termină cu începerea mitozei. Până în această fază celula a devenit aproape de două ori mai mare (*după Campbell A. Neil şi colab., 2003*)

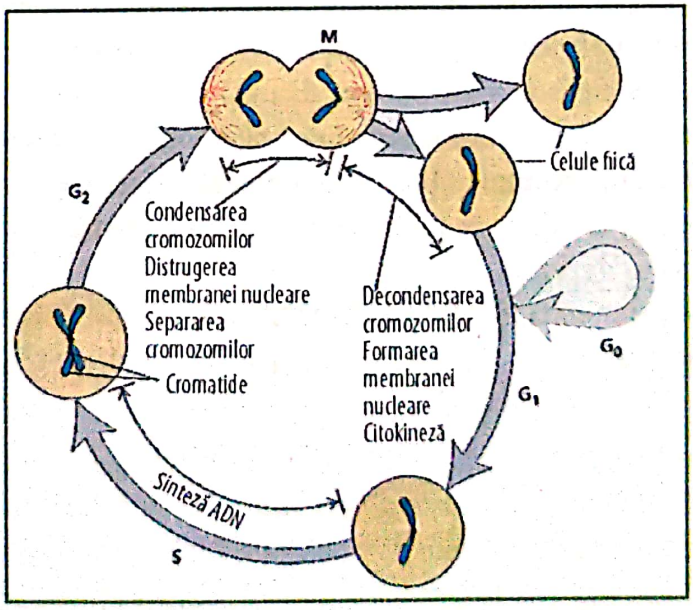


Fig. 32 – Evoluţia unui cromozom părinte de-a lungul ciclului celular la eucariote.
La animalele mamifere este neglijată faza G_1 de neproliferare a celulor. Şi acestea trec în faza G_0. G_0 reprezintă deci o fază de repaus pentru celule care nu intră în reproducţie (*modificată după Lodish şi colab., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

Faza mitotică mai este denumită și **faza M**. Așa cum se observă din figură, faza M (mitoza) ocupă numai 10% din ciclul celulei în timp ce restul ciclului, denumit **interfază**, este ocupat de perioada dintre 2 mitoze.

Rezultă deci că în toate cele trei faze G_1, S și G_2 are loc o creștere a celulei prin sinteza proteică și formarea producției citoplasmatice, adică a organitelor. Repetăm deci: cromozomii se vor dubla numai în faza S (sinteză ADN). Rezultă că:

- celula crește în G_1;
- crește puternic, își copiază, respectiv dublează masa și numărul de cromozomi prin sinteză proteică în segmentul de interfază S;
- își desăvârșește pregătirile și maturația fiziologică pentru diviziune (G2);
- în fine, intră la diviziune și se divide în M, după care ciclul se repetă.

Dacă derulăm așadar filmul vieții, constatăm că înmulțirea celulelor arată că aceasta este un proces neîntrerupt și diamic, de modificări cantitative care conduc la acest formidabil salt calitativ denumit mitoză.

Calitativ și cronologic în timpul derulării mitozei, distingem, de regulă, 5 segmente de evoluție-dezvoltare, și anume: **profază**, **prometafază**, **metafază**, **anafază** și **telofază**. În figura 33 sunt prezentate toate fazele mitozei, la care se adaugă cea pregătitoare G_2. Ele se regăsesc în figură atât sub formă de fotografii la microscop cât și sub formă de desene, pentru ca fenomenele să fie mai ușor de înțeles. ■

1.2.4. Rolul fusului celular

Principalul rol al fusului celular este acela de a distribui cromozomii celor două celule fiice ce se nasc prin diviziune. El este responsabil de aproape tot ce se întâmplă în mitoză, pentru că se formează încă din profază în citoplasma celulei. Are în compoziția lui fibre formate din microtubuli asociate cu diverse proteine (fig. 34).

În această fază apar următoarele componente în celulă:

Cromozomii, la fiecare început sunt dispuși dens lângă nucleu și constituie un centru organizat de microtubuli care la animale conțin și câte o pereche de centrioli, care nu sunt neapărat necesari. Acest lucru este demonstrat de faptul că ei lipsesc la plantele superioare, iar dacă la animale aceștia sunt distruși cu un laser foarte fin, fusul continuă să se dezvolte.

În profaza și prometafaza mitozei, centrozomii se prind unul de altul și, în același timp, sunt legați între ei de fibrele fusului. Tot din ei pornesc fibre sub forma unor radiații stelare. Tot acest ansamblu se numește astru sau aștri (plural). La sfârșitul prometafazei, centrozomii se află deja deplasați spre cei doi poli.

Cromatidele legate ale unui cormozom posedă fiecare un chinetocor, format din mai multe straturi de complexe proteice care în profază se formează în zona centromerilor. De chinetocor sunt prinse câteva fibre ale fusului care pleacă din centrozomi și din această cauză ele se numesc **fibre chinetocorice**. Ele sunt formate în mod normal din microtubuli chinetocorici. Alte fibre ale fusului nu intră în contact cu chinetocorii, ci se suprapun pornind de la poli în zona ecuatorială a celulei. Ele se numesc fibre polare sau polfibre, formate din pol-microtubuli.

Scanned with OKEN Scanner

Este foarte probabil că în prometafază mai întâi fibrele chinetocorice care pleacă de la polii celulelor să se prindă de un chinetocor şi să oblige cromozomul respectiv să se deplaseze în direcţia polului respectiv (opus legăturii fibră - chinetocor). Această mişcare are un recul şi deplasează alţi microtubuli în sens invers, pornind de la celălalt pol, creîndu-se o altă legătură chinetocor fibră (pornind de la polul opus). Aceste mişcări se repetă într-un sens sau altul până când, în final, cromozomii se aşază liniştiţi la mijlocul celulei. În metafază deci toţi cromozomii sunt aşezaţi pe placa metafazică (placă ecuatorială).

Rolul foarte important al fusului în mitoză începe în anafază cu împărţirea centromerilor în câte un cromozom cu care ocazie cromatidele se dezvoltă (probabil prin condensare). Au apărut deci cromozomi independenţi care se mişcă spre cei 2 poli. Experienţele au arătat că aceste chinetofibre de origine chinetocor-microtubuli se scurtează în timpul anafazei, deoarece aceştia împreună cu chinetocorul final suferă o depolimerizare.

Deci, cromozomul se deplasează spre pol pentru că chinetocorul său, cândva înainte de polimerizarea finală, era încă legat în domeniul intact al microtubulilor. Mecanismul exact al acţiunilor acestor schimburi între chinetocor şi microtubuli nu este până astăzi prea bine cunoscut. Între timp se înmulţesc informaţiile care susţin că chinetocorul este prevăzut cu proteine motrice cu ajutorul cărora cromozomul parcurge distanţa „scurtată" a microtubulilor.

Fibrele polare se consideră a avea un rol invers şi anume acela de a asigura întinderea axei polare de-a lungul întregii anafaze. În acest scop, fibrele polare suprapuse în zona ecuatorială a celulei alunecă una peste alta. În locul unei scurtări a fibrelor chinetocorice, aici are loc o mişcare de întindere.

La sfârşitul anafazei, două seturi de cromozomi sunt aşezaţi la cele două poluri opuse ale celulei de pornire (celula care se înmulţeşte), care deja s-a lungit de la un pol la altul.

În fine, în telofază se formează cele două nuclee noi. Simultan cu acest ultim stadiu al mitozei, citokineza se preocupă de împărţirea, diviziunea egală a citoplasmei în cele două celule. ■

1.2.5. Aspecte ale împărţirii citoplasmei în citokineză

Citokineza se suprapune practic peste telofază numai pentru că ea este responsabilă exclusiv de împărţirea şi distribuirea citoplasmei în cele 2 celule fiice.

În condiţiile în care sănătatea celulelor este perfectă toate procesele legate de înmulţire se desfăşoară şi ele perfect după un plan prestabilit în depozitul lor genetic de informare. În consecinţă, şi citokineza se desfăşoară în celulele animalelor după un procedeu bine stabilit, căruia specialiştii i-au spus **rigolă** sau **brazdă**.

Primul lucru care se evidenţiază este apariţia la jumătatea celulei a acestei rigole sau **brazde de separare**. Este ca şi cum o parcelă nearată este însemnată cu o brazdă exact la jumătatea ei. La început apare deci o uşoară adâncitură în apropierea fostei plăci metafazice (fig. 35 a).

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

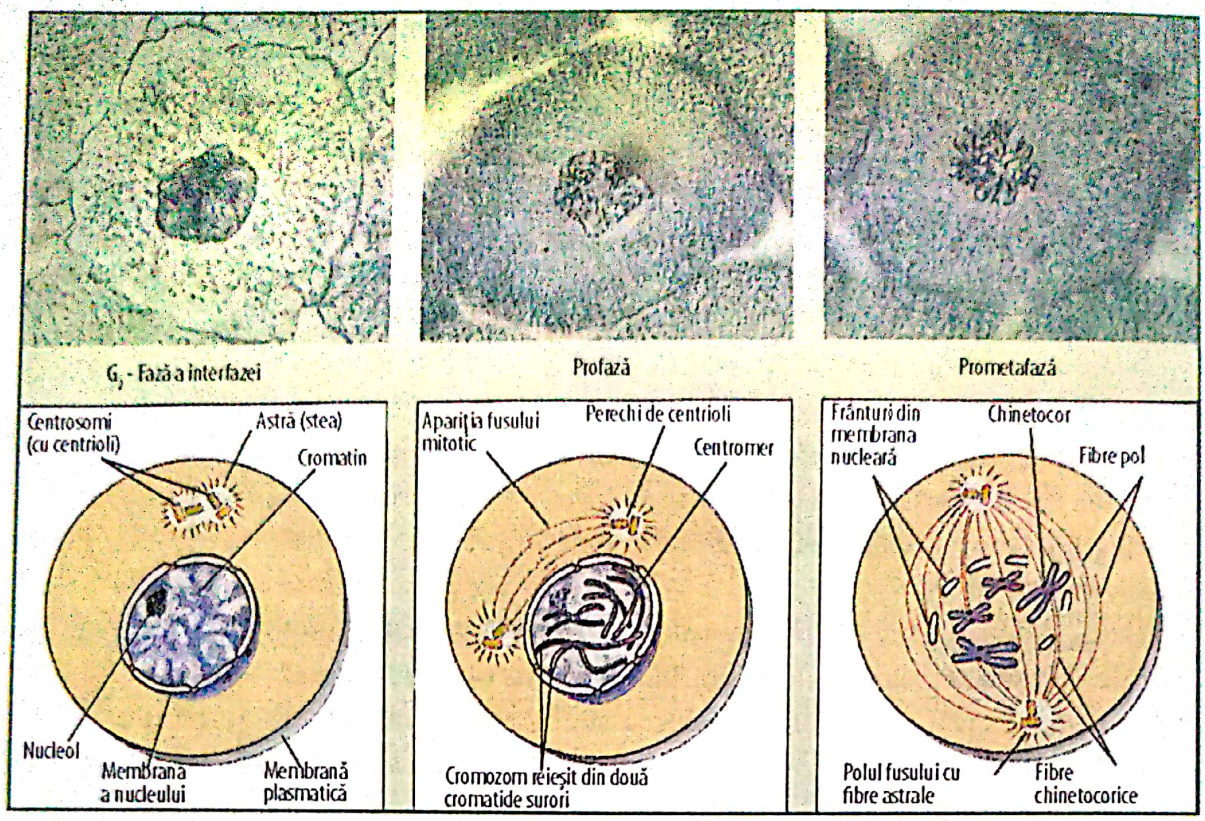


Fig. 33 – Evoluția stadiilor mitotice în cazul unei celule animale
(Lodish și colab., 2001; Campbell A. Neil, 2003)

La sfârșitul interfazei nucleul este bine delimitat și înconjurat de membrană. Conține unul sau mai mulți nucleoli. În afara nucleului se află 2 centrozomi, care provin la începutul interfazei prin dedublarea unui centrozom. În celulele animale, în fiecare centrozom se găsește o pereche de centrioli. Din microtubulii centrozomilor apar fibrele astrale în formă de stele numite astre (stele). Cromozomii au fost deja dedublați în faza S, însă în această fază nu pot să fie recunoscuți individual, deoarece ei se află în formă de fibre cromatice, e drept însă mai lejer împachetate.

În profază, în nucleu și citoplasmă se desfășoară numeroase modificări. În nucleu dispar nucleolii, iar fibrele cromatidice devin mai dense. Ele se condensează în limitele cromozomilor, care pot fi recunoscuți în lumina microscopului. Fiecare dublu cromozom formează 2 cromatide surori identice care sunt legate de centromer. În citoplasmă, între cei doi centrozomi începe formarea fusului mitotic. Fibrele fusului apar dintr-un ghem de microtubuli. În profază, centrozomii se îndepărtează unul de altul, fibrele fusului alunecând însă mai departe și de-a lungul nucleului.

În prometafază, membrana nucleului plesnește. Acum fibrele fusului pot pătrunde în nucleul celulei și intră în contact cu cromozomii care au devenit și mai condensați. De la amândoi polii se trage un buchet de microtubuli până la ecuatorul celulei. Fiecare din cele 2 cromatide ale unui cromozon dispun acum de un chinetocor propriu, o structură specializată a centromerilor. Anumite pachete de microtubuli, denumite și fibre chinetocorice se leagă de chinetocori și această construcție împiedică mișcarea înapoi a cromozomilor. Celelalte pachete de microtubuli se suprapun ca fibre pol între cei 2 poli ai fusului așezați vizavi unul de altul.

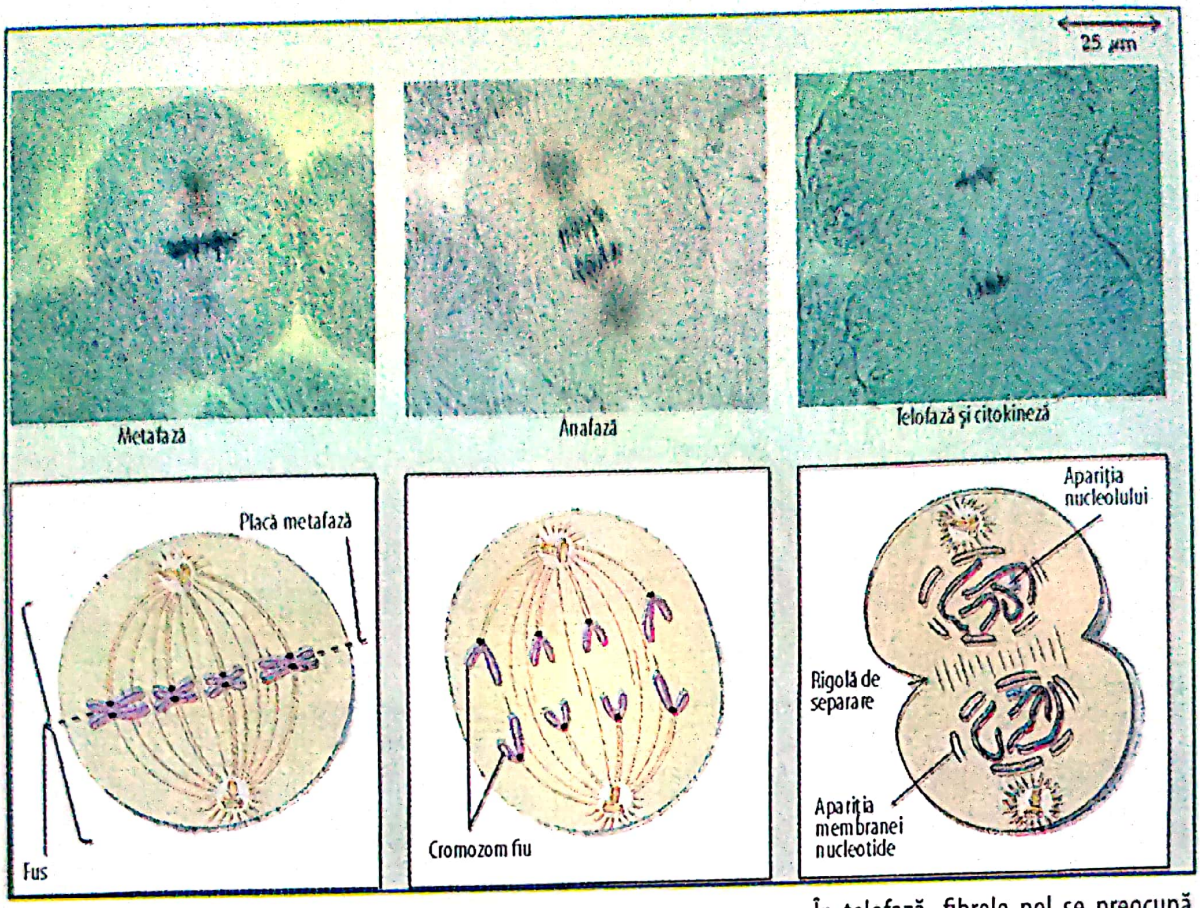


Fig. 33 – Continuare.

Centrozomii se află deja la cei doi poli. Cromozomii s-au ordonat deja pe placa metafazică, o construcţie aşezată la mijlocul dintre cei 2 poli. Mai este numită şi placa ecuatorială. Centromerii tuturor cromozomilor se află la o anumită înălţime, iar cromatidele surori se află de ambele părţi ale plăcii metafazice. În felul acesta, chinetocorii lor apar la polii opuşi. În fiecare cromozom, cele două cromatide surori sunt legate prin fibre chinetocorice de polii celulelor. Întregul aparat format din fibre chinetocorice, fibre pol şi fibre astrale se prezintă, din cauza formei sale, ca un fus.

Anafaza începe cu separarea cromatidelor gemene ale fiecărui cromozom la locul lor de contact - centromerul. Prin aceasta, fiecare cromatidă devine un cromozom independent. În final, cromatidele gemene se mişcă separat spre fiecare din cei 2 poli. Deoarece chinetocorul se află deja în zona centromerilor, acesta este primul care se deplasează, mai ales dacă chinetofibrele sunt scurte (viteza de deplasare este de 1 µm/min.). Simultan, polii se deplasează în continuare îndepărtându-se. La sfârşitul anafazei la ambii poli se află setul complet de cromozomi.

În telofază, fibrele pol se preocupă pentru o prelungire în continuare a celulei şi de rotunjirea polilor unde cromozomii s-au grupat laolaltă. Începe formarea noilor nuclei celulari. Membranele lor se formează din lamele şi fragmente de tip vezicul, care au aparţinut membranei nucleare, ca şi din alte părţi ale sistemului de membrane interne. Evoluţia în continuare a procesului constă într-o întoarcere la profază şi prometafază. Nucleolii reapar din nou, iar fibrele cromatinice şi cromozomii se nasc şi se observă din ce în ce mai puternic. Cu aceasta mitoza este încheiată apărând 2 celule identice d.p.d.v. genetic. În paralel se desfăşoară şi procesul de citokineză - se formează citoplasma care, de asemenea, în mod identic o repartizează celor 2 celule. În celulele animalelor, citokineza conduce la fenomenul de gâtuire şi separare a celulelor de-a lungul unei rigole de separare.

Scanned with OKEN Scanner

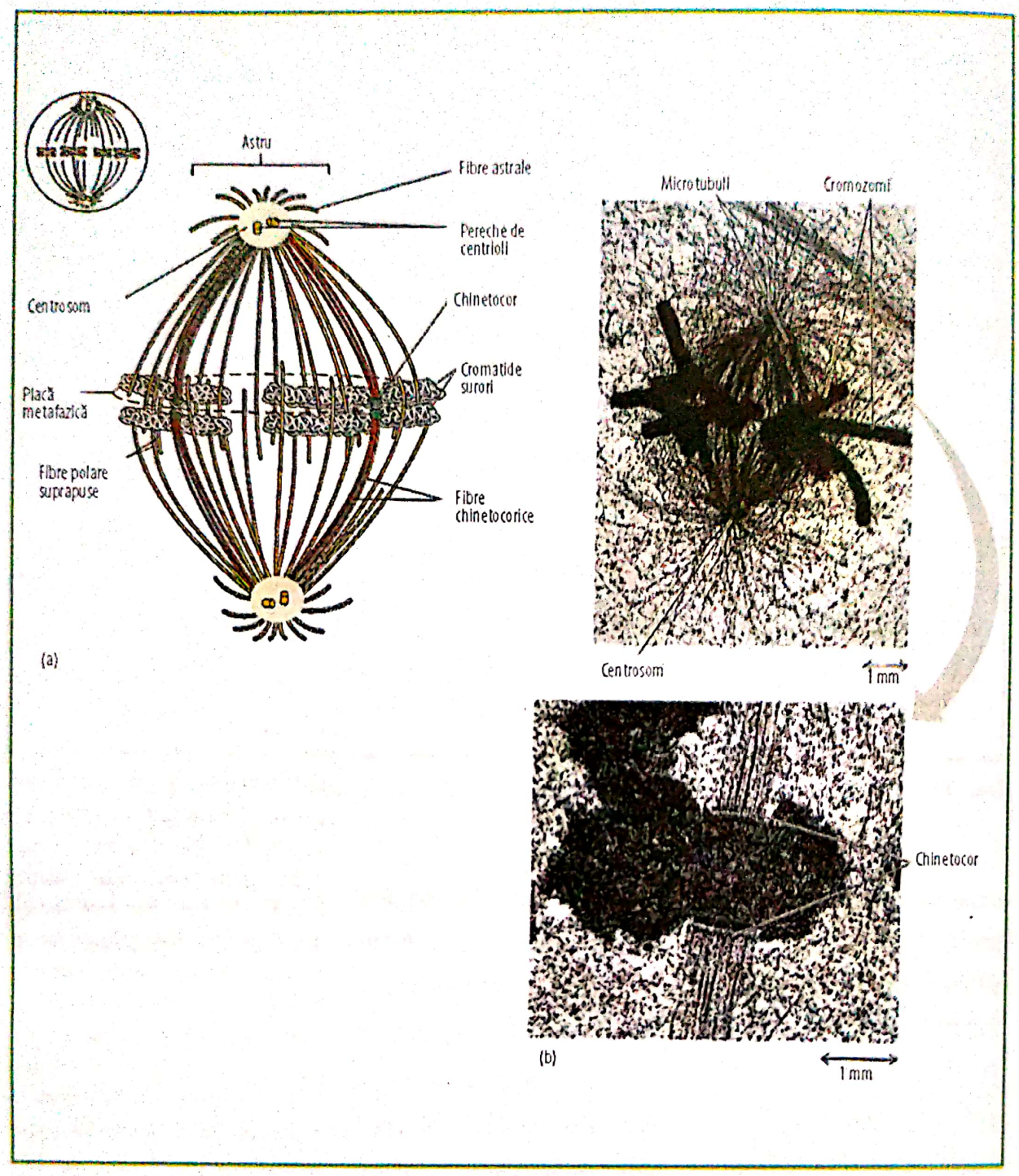


Fig. 34 – Fusul mitotic în metafază.

a) Cromozomii sunt ordonați pe placa metafazică, legați de fibrele chinetocorice. Acestea din urmă fac legătura cu cromozomii celor 2 poli. De fapt, ele derivă din aceştia pentru că un alt buchet de microtubuli formează fibrele polare, care însă nu sunt legate de cromozomi şi care se suprapun în zona plăcii metafazice. Spre deosebire de figura 33, desenul de mai sus prezintă mai multe detalii ale mitozei în faza de metafază.

b) În cele 2 fotografii TEM din dreapta se poate observa că chinetocorii orientează, îndrumă, cromatidele gemene ale unui cromozom spre cei 2 poli opuşi *(Mc. Intash şi colab., 1991)*

Scanned with OKEN Scanner

Pe partea interioară, citoplasmatică a rigolei se formează un **inel contractil** format din fibre actin, alcătuit din același model de proteine care servesc la contractarea mușchilor și a altor feluri de celule care se mișcă și care joacă un rol cheie.

Dacă inelul actinic se leagă prin acțiuni de schimb cu **miozinul**, dezleagă, desfac celulele în zona ecuatorială, exact de-a lungul rigolei separatoare. Odată cu ruperea ultimei legături, celulele fiice devin complet independente.

În cazul plantelor, datorită pereților celulari puternici, citokineza se derulează complet diferit; nu întâlnim la plante o rigolă de separație. În locul acesteia, în telofază, se formează o placă celulară, adică o structură cu totul nouă. Ea apare la mijlocul celulei care se divide (celula mamă) și înlocuiește placa metafazică prezentă anterior (fig. 35 b).

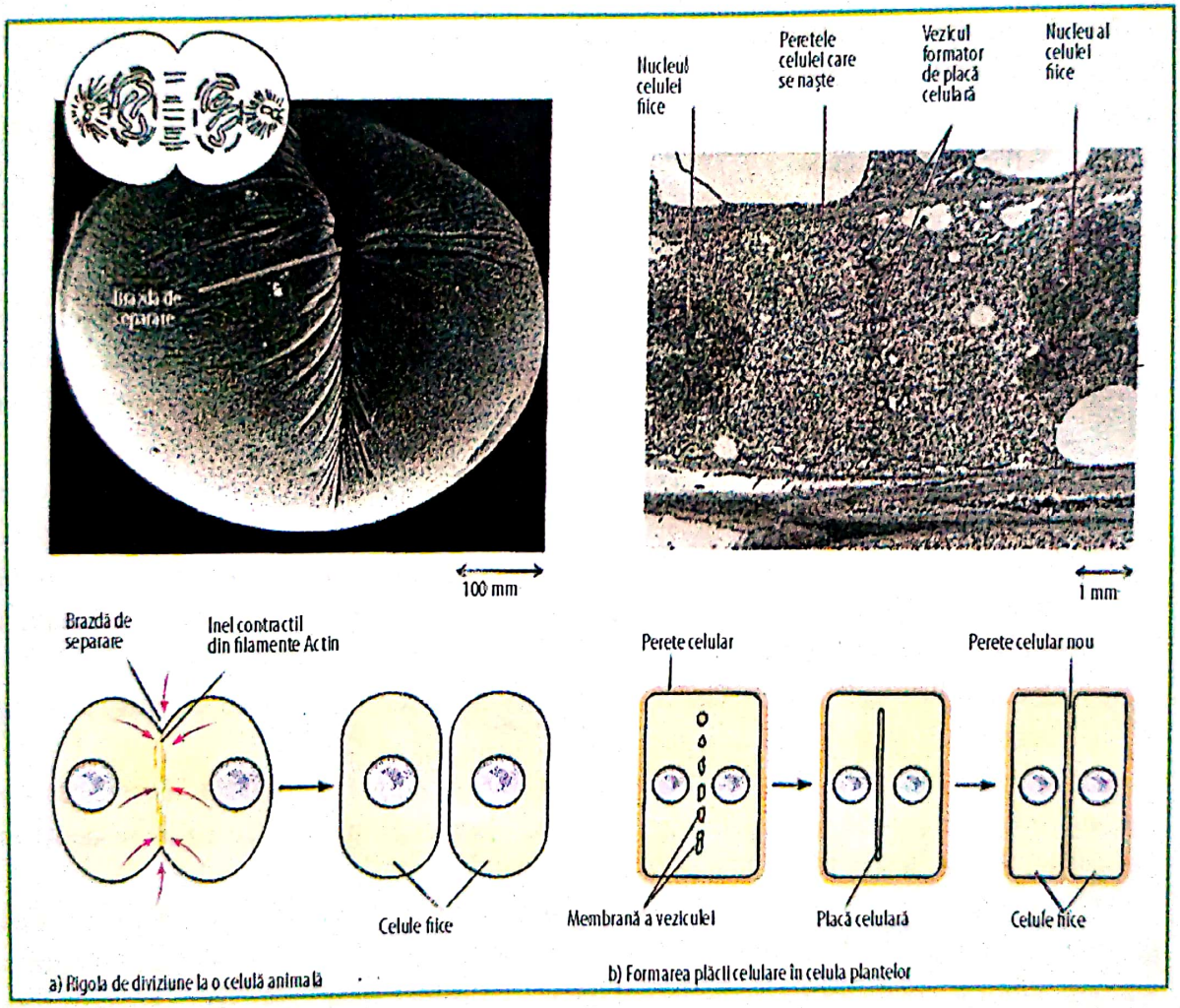


Fig. 35 – Comparație între citokineza la animale și plante.
a) În această fotografie REM (Rețea Electronică Microscopică), în stânga, se poate observa suprafața unei celule animalice cu rigola de diviziune. În această zonă membrana plasmatică formează imediat un inel din filamente actin. Acest inel realizează prin schimburile cu miozinul o acțiune de adâncire permanentă a brazdei până ce acestea se desprind una de alta.
b) Într-o fotografie TEM, în dreapta, este prezentată o celulă dintr-o rădăcină embrionară de soia în telefază. Se observă formarea la poli a celor 2 nuclei celulari. În același timp, în zona ecuatorială membranele vezicului se topesc și conduc la apariția unei membrane duble care formează, delimitează platoul (placa) celulară. În spațiul delimitat de cele 2 membrane sunt trimise diferite substanțe, din care se formează apoi noii pereți celulari *(după Campbell A. Neil și colab., 2003)*

Scanned with OKEN Scanner

Veziculul care se formează în aparatul Golgi se deplasează de-a lungul microtubulilor, în zona ecuatorială unde se reunesc, se acumulează. Prin topirea lor rezultă în formă lineară o dublă membrană, adică **placa celulară** care, în final creşte împreună cu membrana plasmatică.

În felul acesta se nasc cele două celule fiice, fiecare cu membrana sa plasmatică. Între cele două membrane ale plăcii celulare se formează finalmente peretele celular.

Există încă numeroase detalii pe care specialiştii în biologie celulară încă şi astăzi le discută controversiv. Acestea sunt, probabil, acele incertitudini care fac ca aplicarea în practică a biotehnologiilor celulare să nu ducă încă la rezultate scontate, aşteptate, spectaculoase.

Detaliile nelămurite ale proceselor înmulţirii celulelor vor putea fi clarificate numai prin experienţe dificile. Coreografica complicată a mitozei reprezintă în evoluţia organismelor o secvenţă extrem de importantă, exact pentru faptul că a rezolvat problema transmiterii prin ereditate a ADN-ului genomului la marea grupă a eucarioţelor. ■

1.2.6. Semnalele externe celulelor coordonează diviziunea celulară

Pentru dezvoltarea normală a organismului, viteza diviziunii celulelor în diferitele ţesuturi ale organismului este de o importaţă decisivă. Creşterea, dezvoltarea şi vitalitatea organismelor pluricelulare depind de acest proces. La diferitele tipuri de celule pot fi identificate numeroase modalităţi de diviziune - înmulţire.

- Celulele pielii la oameni, de exemplu, se înmulţesc foarte des de-a lungul întregii vieţi a individului. Celulele ficatului, dimpotrivă, îşi păstrează capacitatea de a se înmulţi fără s-o facă frecvent, decizia pentru o înmulţire frecventă este luată numai în momentele în care este necesară o însănătoşire a organului, urmare a unei boli, a unor degradări.
- Unele celule, extrem de specializate, cum sunt cele nervoase şi musculare la omul adult nu se mai înmulţesc deloc.

Cu ajutorul unui sistem de culturi artificiale de celule a putut fi identificat un număr foarte mare de factori fizici şi chimici care acţionează, fie ca stimulenţi ai înmulţirii, fie ca ca inhibitori ai acesteia.

Există numeroase experienţe făcute pentru a demonstra acest lucru care pot fi găsite în literatură pe care o indicăm (Campbell A. Neil - *Biologie* - Berlin - Oxford, 2000; Lodish şi colab. - *Moleculare Zellbiologie* - Berlin, 2001). Nu este necesară prezentarea lor în această lucrare.

Oricum, reţinem faptul că diviziunea celulelor în medii de cultură nu funcţionează dacă lipseşte un element de nutriţie. Dar, chiar dacă toţi factorii de creştere sunt întruniţi, înmulţirea lor este blocată dacă lipsesc din mediu aşa-numitele **substanţe regulatoare**. Fibroblastele, de exemplu, celule importante ale ţesuturilor de legătură (ligamente, de ex.) au nevoie pentru a se înmulţi de un factor de creştere denumit în engleză ***plated derived growth factor, PDGF*** - un fel de lamelă sanguină. Celulele trag pe suprafaţa lor receptorii pentru PDGF şi numai dacă factorul de creştere se leagă acolo, se declanşează înmulţirea celulei.

Scanned with OKEN Scanner

Pornind de la aceste **rezultate experimentale formidabile**, practicienii (biotehnologii) s-au gândit la crearea *in vitro* a unor celule superspecializate care **apoi să fie injectate organismelor bolnave, tocmai pentru că nu dispun de asemenea celule (ficat, sistem nervos etc.).**

Regulatorii de înmulţire a celulelor de tip PDGF pot fi aplicaţi *in vitro*, ei acţionează însă şi *in vivo*, adică în organismul oamenilor, animalelor şi plantelor. Rezultate bune s-au obţinut mai ales la mamifere. Lamelele sanguine se pot asocia celulelor sanguine, deşi realmente nu pot fi denumite CELULE. Ele plesnesc în apropierea unei zone bolnave distruse (rană, de ex.) şi eliberează PDGF. Aceasta blochează imediat înmulţirea fibroblastelor, reacţie care contribuie la însănătoşirea rănii). Cercetările au demonstrat şi au descoperit existenţa şi înregistrarea unei serii întregi de factori de creştere. Fiecare tip de celule corespunde unui anumit factor de creştere specific sau unei combinaţii de factori. Este de prisos să mai insistăm asupra importanţei practice deosebite a acestor cunoştinţe. Ele stau la baza creării „celulelor organice" - viitoarele transplanturi de organe în medicina modernă biotehnologică.

Un alt factor de influenţă care coordonează diviziunea celulară este densitatea celulelor (fig. 36).

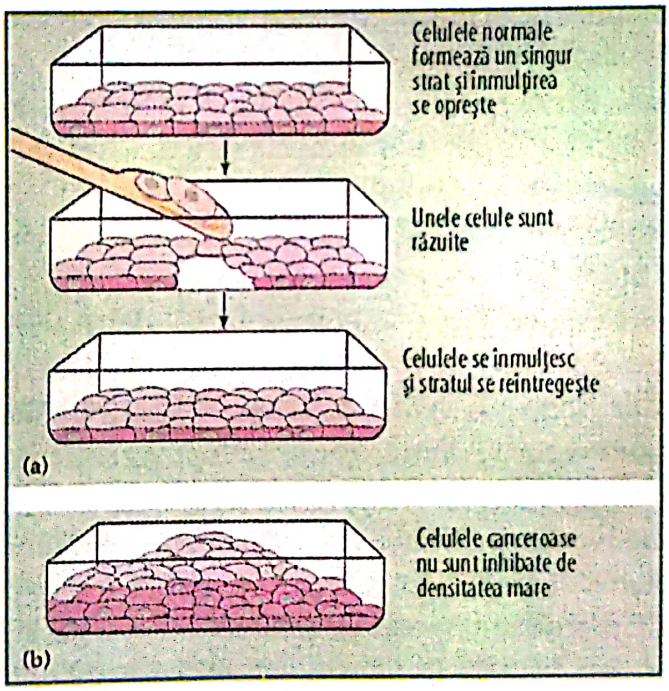


Fig. 36 – Corelaţia negativă între densitatea celulelor şi înmulţirea lor
a) Celulele normale se înmulţesc într-o cultură numai atâta vreme cât creează un strat neîntrerupt (monolayer). Densitatea populaţiei de celule este delimitată de hrană ca factor de creştere ca şi de posibilitatea legării între ele. Dacă se înlătură câteva celule, cele marginale găurii se înmulţesc până se reface stratul.
b) Celulele canceroase, dimpotrivă, continuă să se înmulţească de maniera formării unor grămezi diforme din aceste celule *(Lodish şi colab., 2001)*

În cultură, celulele se înmulţesc în mod normal până în momentul formării unui strat continuu denumit **monolayer**. În acest moment celulele îşi încetează înmulţirea.

Scanned with OKEN Scanner

Prin îndepărtarea însă a câtorva dintre ele, rezultă un gol în stratul respectiv. În acest moment reîncepe diviziunea celulelor vecine „golului", până ce stratul este refăcut în întregime. Umplerea stratului frânează înmulţirea, fenomen denumit „frânarea înmulţirii corelată cu densitatea celulelor".

Oprirea înmulţirii este determinată şi de posibilitatea celulelor de a se ancora de ceva. Acest ceva este fundul vasului de reacţie în cazul culturilor de celule sau este matrixul extracelular în cazul organismelor. Pierderea posibilităţilor de ancorare face ca celulele să-şi piardă capacitatea de înmulţire. Celulele canceroase, despre care vom vorbi în această lucrare, nu se supun acestei legităţi.

O corectă derulare a ciclului celular este decisivă pentru o supravieţuire sănătoasă a organismului. Lumea vie este atât de bine organizată încât la trecerea de la o fază la alta există aşa-numitele puncte de control în care are loc un atent „control de calitate" al celulelor, înainte ca ciclul celular să reînceapă. Controlul decisiv care permite sau nu începerea ciclului este faza G_1 a ciclului celulei. Un control absolut special, am spune dur, se situează la sfârşitul fazei G_1, foarte puţin înaintea începerii sintezei ADN, adică a fazei S. În acest **punct de control G_1**, denumit şi **punct de restricţie**, decizia care se ia este totul sau nimic. Dacă celulele depăşesc acest punct, pentru că semnalele genetice indică că totul este în ordine în celule, atunci ADN-ul se multiplică (se dedublează) şi, în final, are loc diviziunea celulei. Celula poate să depăşească punctul de control, de restricţie, dar să nu intre în diviziune, ci să fie transferată în G_0 (fig. 32). În corpul omenesc, majoritatea celulelor se află în faza de aşteptare G_0. Celulele cele mai specializate, cum sunt cele nervoase şi musculare nu se mai înmulţesc deloc. Altele, cum ar fi cele hepatice, revin în urma unor semnale în ciclul celular, ca urmare a unui factor de creştere indus de existenţa unei boli sau leziuni.

Mărimea celulei este un factor important în pasajul G_1. Dacă celulele nu ating dimensiunile impuse de criteriile de calitate, sinteza ADN nu începe şi ele sunt respinse la „punctul de frontieră". Pentru ca celula să atingă dimensiunile solicitate, un rol important îl joacă raportul dintre volumul citoplasmei şi mărimea genomului.

În timp ce prin înmulţirea celulei volumul citoplasmei creşte, cantitatea de ADN din nucleu rămâne constantă. Probabil că celula depăşeşte punctul de restricţie dacă acest raport al volumelor creşte peste o anumită valoare a unui prag predefinit. Există deci un mecanism de reglare a trecerii punctului de restricţie, care se orientează după mărimea celulei. ■

1.2.7. Reglementarea biochimică a ciclului celular

S-a observat din cele expuse mai sus că punctul de restricţie din G_1 nu dispune de decizia finală şi că orice celulă scăpată în faza S este ireversibil obligată să treacă prin G_2 şi, firește, prin faza M, indiferent dacă condiţiile externe şi de nutriţie sunt sau nu îndeplinite. Aceasta nu înseamnă însă că celula în cauză a scăpat complet de sub control. Dimpotrivă, ea a trecut acest „hop" pentru că a îndeplinit deja anumite condiţii, anumite funcţiuni chiar înainte de punctul de trecere. Există un fel de „computer" biochimic coordonat de anumite gene care studiază potenţialul celulelor şi decide ca

Scanned with OKEN Scanner

acestea să treacă în fazele următoare așa cum au fost ele descrise anterior. Asupra modului cum funcționează acest „computer" există unele puncte de vedere diferite între marii reprezentanți ai școlilor de biologie moleculară, cele mai reprezentative din lume în acest moment. Noi vom extrage din ambele curente pe cele care aduc cele mai multe argumente experimentale.

Lodish și colab. (2001) consideră că întreg ciclul celular este condus de către fosforilarea și descompunerea proteinelor. Citățm: „Prin procedee biochimice și genetice, ca și prin recombinări ale ADN-ului, ciclul celular al eucariotelor a fost studiat din diferite unghiuri. Dublarea celulelor a fost urmărită în dinamică la diferite momente, însă două dintre ele sunt decisive: **sinteza ADN și mitoza**.

Aceste procedee, procese, sunt coordonate de 2 grupe mici de **chinase proteice heterodimere**, care se formează ca urmare a unor **subunități regulatorii și catalitice**. Căutând acum aceste subsecvențe **proteice regulatorii** am aflat că au fost denumite de cercetători **cicline**, tocmai pentru că ele se ocupă de buna funcționare a ciclului celular.

Cealaltă secvență proteică, cu subunități cu rol catalitic, se numește chinasă dependentă de cicline (cyclin-dependent kinases - **cdks**), și aceasta pentru că ea și chinasa devin active numai după o asociere indispensabilă. Subsecvența catalitică se poate uni însă cu diferite cicline, ca apoi să se constate care proteine sunt fosforilate de către complexul cdk-ciclină.

În figura 37 se prezintă însă un **model actual, mai recent, privind reglarea ciclului celular** la eucariote folosind 3 cdk-ciclin-complexe.

Fiecare dintre aceste complexe este activ pe perioada fazelor G_1, S și pe perioada mitozei. De îndată ce o celulă primește o comandă specială privind înmulțirea, complexele G_1-cdk (G-cdkc) se exprimă imediat. Ele pregătesc celula pentru a intra în faza S. În faza S se activează anumiți factori de transcripție care la rândul lor activează enzimele pentru sinteza ADN ca și pentru complexele fazei S-cdk. În prealabil, acestea au fost frânate de către un inhibitor specific, care în faza G_1 au fost descompuse prin acțiunea complexului G_1-cdk. În felul acesta complexul [faza S-cdk] devine activ și se îngrijește pentru avansarea proceselor în faza S.

Următoarea etapă constă în activarea unor complexe de prereplicare a ADN prin activarea regulatorie a unor poziții pe proteinele fosforilate prezente acolo încă din G_1 în fosta poziție de replicare. Prin fosforilarea de mai sus se inhibă replicarea în continuare a ADN-ului, aceasta limitându-se la o singură replicare, pentru a avea un număr corect de cromozomi în amândouă celulele.

Complexele cdk-mitotice se formează și ele în fazele S și G_2 și devin inhibitoare până la sfârșitul sintezei ADN. După activarea lor, complexele cdk-mitotice induc condensarea cromozomilor, distrugerea membranei nucleare, construcția fusului mitotic și dispunerea cromozomilor condensați la nivelul metafazei (fig. 33). De îndată ce cromozomii în întregimea lor sunt legați la microtubulii fusului, complexul cdk-mitotic activează o altă structură și anume complexul de stimulare a anafazei (anaphase promoting complex APC), un complex multiproteinic care provoacă o pro-

Scanned with OKEN Scanner

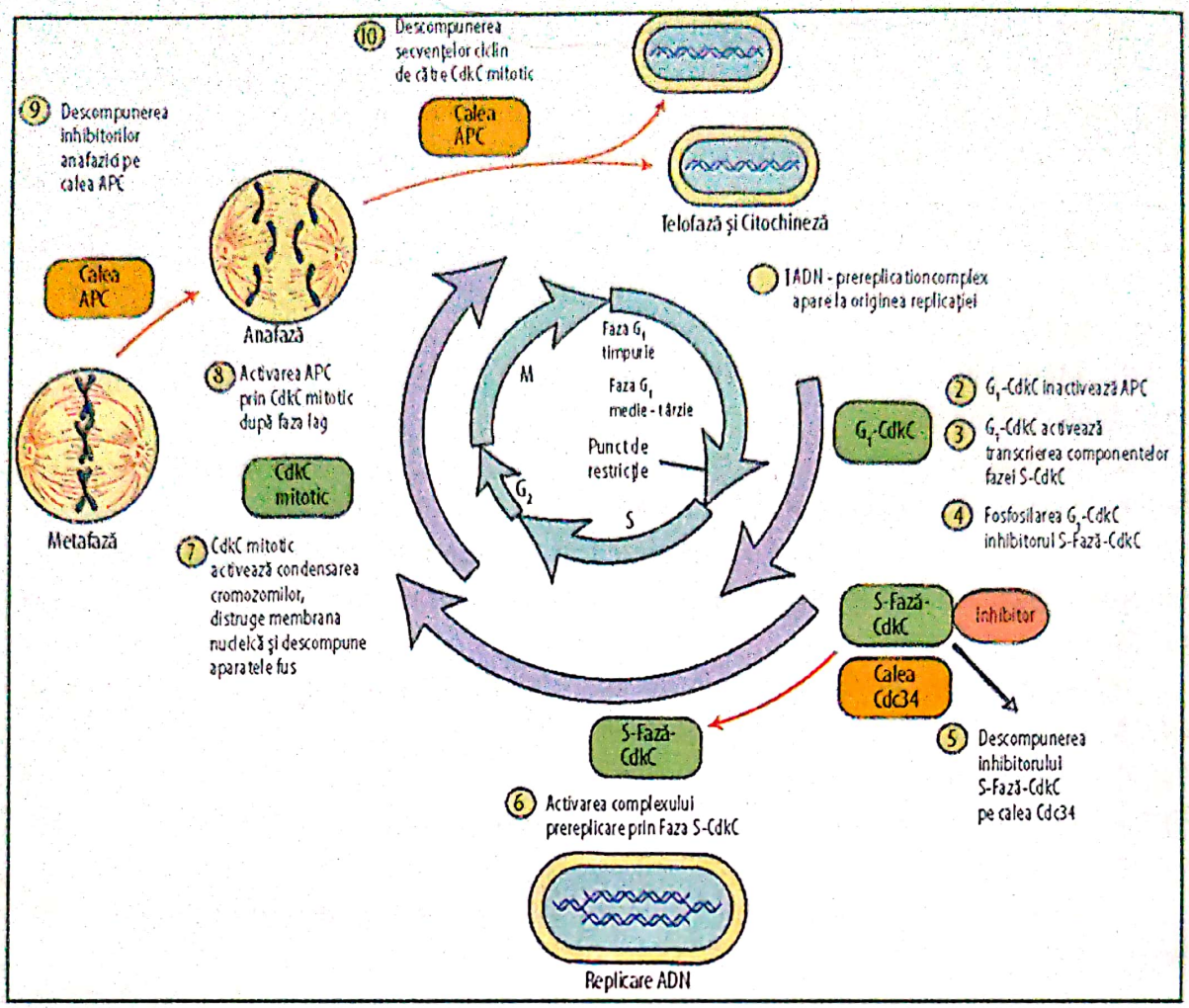


Fig. 37 – Model actual privind reglarea ciclului celular la eucariote.
Derularea ciclului este coordonată de diferite complexe care rezultă din fazele G_1 - S, respectiv ciclin mitotic ca și chinază dependentă de ciclină (desenate în verde) (Cdkc). În aceste complexe se prezintă factorul regulator ciclina și cel catalitic chinaza dependentă de ciclină - în experiment la calea cdc34 și la calea APC. Complexele proteice (ocru) au fost marcate cu poliubiquitin. Printre ele și inhibitori-fază-S, anafază, substanțe ca și ciclina mitotică. Marcarea activează descompunerea acestor substrate pe proteozomi. Deoarece descompunerea proteinelor este ireversibilă, derularea ciclului se face într-o singură direcție. Prin proteoliza inhibitorilor anafazici, complexele proteice sunt inactivate, proteine care în metafază leagă cromatidele gemene. Prin aceasta, anafaza este indusă *(prelucrare după Lodish și colab., 2001)*

teoliză dependentă de ubiquitină a substanțelor de încetinire a anafazei și inactivează complexele proteice care leagă între ele în metafază cromatidele gemene. Descompunerea inhibitorilor, coordonează anafaza în a cărei derulare cromatidele gemene ajung la polii opuși ai fusului. În anafaza târzie APC conduce, de asemenea, la descompunerea ciclinei mitotice. În felul acesta, activitatea cdk-ului mitotic scade și de acum cromozomii separați se pot decondensa. În telofază se formează și o membrană a nucleului pentru celule fiice, citosolul se divide în procesul de derulare a citochinazei și rezultă 2 celule fiice.

Scanned with OKEN Scanner

În faza G_1 a următorului ciclul, anumite proteine vor fi defosforilate cu ajutorul fosfatazei. În felul acesta ele devin active şi tot ele sunt acelea care apoi construiesc baza de pornire a replicării complexului de prereplicare şi prin aceasta celulele sunt pregătite pentru intrarea în următoarea fază S. APC în faza întârziată G_1 va fi fosforilat de către complexul G_1-cdk şi prin aceasta va fi şi el inactivat, Ca urmare, în fazele S şi G_2 apare o acumulare a ciclinelor mitotice.

Putem acum afirma, având dovezile ştiinţifice prezentate mai sus că ciclurile celulare cuprind trei etape decisive şi ireversibile, şi anume:

a) trecerea de la faza G_1 la faza S;
b) metafază → anafază;
c) anafază → citokineză.

Aceste puncte de trecere care apar ca nişte bariere biologice vor fi survolate de către celule printr-un proces coordonat genetic de descompunere a anumitor proteine, în aşa fel încât celulele intrate în ciclul de evoluţie vor putea să se mişte numai într-o singură direcţie.

În cazul organismelor superioare, controlul asupra ciclului celular se va exercita în principal printr-o coordonare-optimizare a sintezei şi activităţii complexului G_1-cdk, a cărui sinteză poate fi stimulată cu ajutorul unor factori de creştere denumiţi şi factori mitogeni.

Aşadar, activitatea complexului cdk poate fi regularizată prin fosforilarea anumitor inhibitori şi activarea locurilor ocupate deci de secvenţele, subunităţile catalitice. În felul acestă factorilor mitogeni (de creştere) li se lasă o perioadă mai îndelungată de a acţiona asupra celulelor. Mitoza se va derula cu uşurinţă chiar dacă în final factorii de creştere vor fi fost îndepărtaţi. Revenim deci şi afirmăm că există un punct în faza G_1 întârziat, care trebuie depăşit, traversat, traversare care apare acolo neinfluenţată de ciclul celulei şi pe care încă de la început l-am denumit **punct de restricţie.** ■

1.2.8. Prin cercetare, proteinele care reglementează ciclul celulei au putut fi identificate şi izolate

S-au efectuat numeroase experimente cu culturi de celule recoltate de la diverse mamifere, colectându-se informaţii valoroase. S-a dovedit deja că ciclul celular este coordonat de capacitatea de difuzie a factorilor. După fuziunea celulelor interfazice cu celule în fazele G_1 - S sau G_2 s-a dizolvat membrana celulară în componentele de fuziune ale veziculului (din care de fapt a provenit), iar cromozomii s-au condensat (fig. 38). Cel puţin unul din factorii cu capacitate de difuziune în citoplasma celulelor mitotice ar trebui deci să conducă, să provoace derularea fenomenului mitotic în nucleul interfazic al altor celule. Între timp, am aflat deja că printre aceste componente se află complexul cdk-mitotic.

La fuziunea celulelor în G_1 cu celule aflate în faza S s-a marcat ADN-ul nucleului în G_1 cu Tiamidin radioactiv. Ca urmare, sinteza ADN în acest nucleu s-a realizat la scurtă vreme după fuziune. Dacă fuzionează celule din faza G_2 cu celule în faza S, tiamidina radioactivă nu se mai formează în nucleul G_2. Rezultă că în stadiul G_2 nu

Scanned with OKEN Scanner

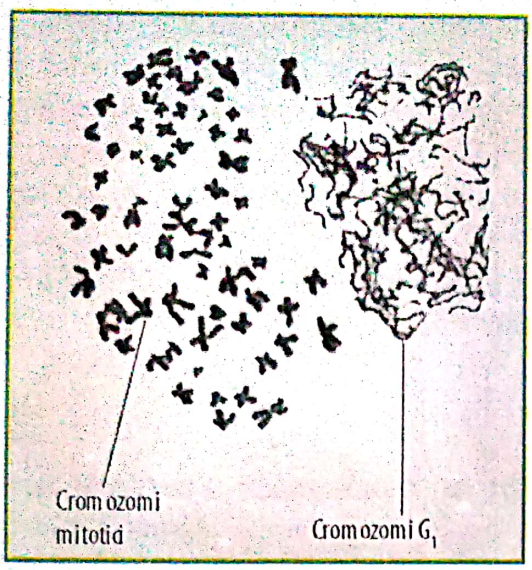


Fig. 38 – Fuziunea celulelor mitotice cu celule interfazice care se află în faza G_1.
La celulele mitotice lipsesc membranele celulare, iar cromozomii replicați sunt foarte puternic condensați. În fotografie celulele fuzionate în G_1 au membrana nucleară dizolvată și de aceea sunt greu de recunoscut. Cromozomii se condensează numai parțial. Nu rezultă nici o pereche de cromozomi omologi. Cromatidele gemene ale cromozomilor mitotitici sunt legate la centromer și ușor de recunoscut (*după Johnson R.T., Rao P.H. - 1970, Biol. rev., 46-97*)

se realizează nici o sinteză ADN. Dimpotrivă, acest lucru se întâmplă în nucleele G_1, datorită factorilor de difuziune. Prin cercetări de fuziune a celulelor s-a demonstrat că factorii cu capacitate de difuziune activează ca regulatori la începutul fazelor S și M, **factori care au putut fi identificați prin metodologii genetice și biochimice.**

Ciuperca ce fermentează berea *Sacharomyces cerevisiae* și ruda sa mai îndepărtată *Schizosacharomyces pombe* ar putea fi foarte bine utilizate pentru izolarea unor mutante, cu ajutorul cărora ciclul celular ar putea fi întrerupt într-un anumit loc sau coordonarea, programarea ciclului celular ar putea fi complet modificată.

La amândouă speciile de ciuperci, mutantele – temperaturo-intensive – cu defecte la anumite proteine, implicate în derularea ciclului celular pot fi ușor descoperite microscopic (tocmai datorită acestor defecte), și apoi se găsește ușor o cale spre a fi izolate. Celulele fiice de *Sacharomyces cerevisiae*, provenite în prealabil din „mugurii" a căror mărime este la fel ca cea a celulelor-mamă, cresc rapid. Celulele mutante de *Sacharomyces cerevisiae* având o evoluție plină de greșeli a ciclului în derulare, pot fi ușor identificate, deoarece formarea mugurilor la temperaturi nepermisive este blocată (fig. 39).

Aceste celule sunt definite ca **mutante cdc** (cell division cycle) adică mutante ale celulelor ce se înmulțesc. Celulele de *Sacharomyces pombe* își formează celule fiice de o manieră diferită în sensul că ele cresc foarte mult în lungime și atunci se divid la mijloc. Repetăm, afirmând că aceste mutante cdc, aparținând acestor fibre de ciuperci nu se divid la temperaturi nepermisive și, ca urmare, își formează celule extrem de alungite.

După transformarea celulelor mutante utilizând o bibliotecă de gene din ADN-ul tipurilor sălbatice de celule, celulele transformate sunt cultivate inițial la temperaturi permisive și apoi la temperaturi nepermisive (35°C). Fiecare dintre celulele transformate ocupă un singur plasmid cu un fragment al ADN-ului genomic. Pe cele mai multe din aceste fragmente se află gene care însă codează proteinele greșite cdc (gene X sau Y). Cu aceste fragmente, celulele transformate nu pot să formeze colonii la

Scanned with OKEN Scanner

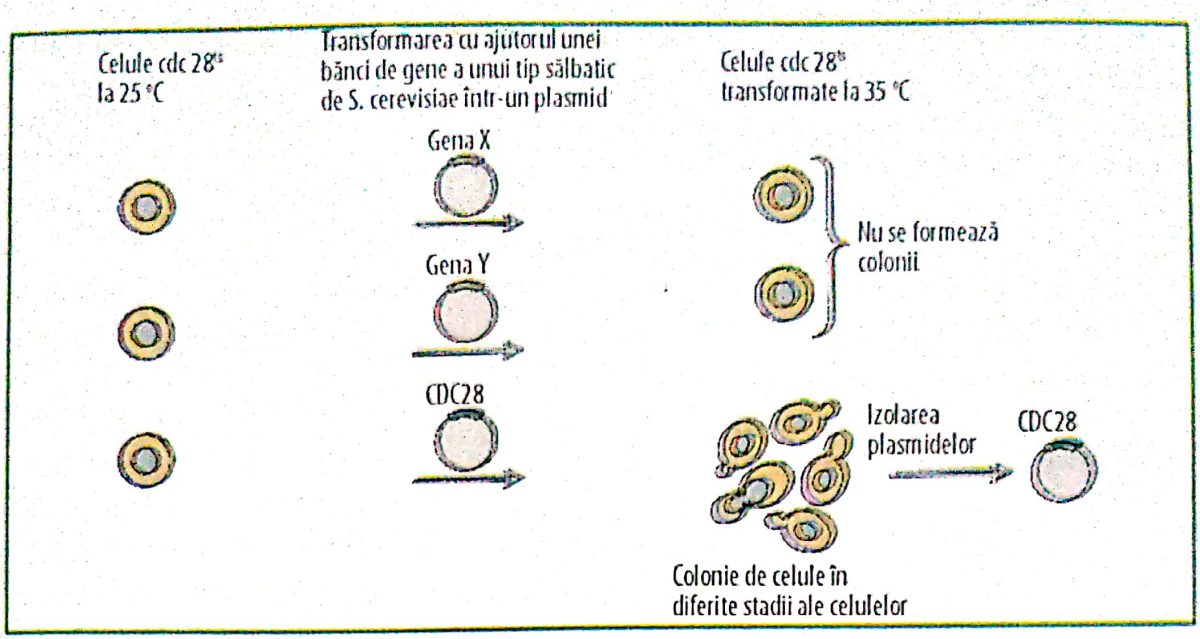


Fig. 39 – Izolarea unor tipuri sălbatice de gene cdc, cu ajutorul unor mutante CDC temperaturo-intensive la *Sacharomyces cerevisiae* (*Lodish şi colab., 2001*)

temperaturi nepermisive. În puține colonii totuși o celulă ia un plasmid care conține tipul sălbatic al genei mutante (în acest caz cdc 28^{ts}), prin care el, plasmidul, devine complementar, iar celula se poate dubla și poate forma o colonie la temperaturi nepermisive. Din această colonie plasmidul purtând gena sălbatică cdc se izolează. În mod asemănător se pot izola forme de tip sălbatic al genei cdc și la *Sacharomyces pombe*. Această experiență demonstrează că prin găsirea celei mai potrivite gene, se pot realiza modificări esențiale în comportamentul celulelor, care pot conduce prin manipularea dorită spre comportamentele dorite de cercetători.

O altă mutantă a speciei *Sacharomyces pombe* este cunoscută ca mutanta-wee (wee înseamnă „mic" în limba scoțiană).

Mutațiile sensibile la temperaturi care blochează derularea ciclului la temperaturi nepermisive împiedică formarea coloniilor la celulele haploide ale ciupercilor. Tipurile sălbatice naturale de mutații, recesive la temperaturi intensive, se pot uşor izola în măsura în care celulele ciupercii haploide mutantă la temperaturi nepermisive (35°C), cu ajutorul plasmidului fabricat în baza de date de tip sălbatic se transformă și se aplatizează (fig. 38). Dacă mutația recesivă printr-un model sălbatic devine complementară plasmidului genei-bibliotecă, mutanta transformată formează o colonie, iar plasmidul, prin modelul sălbatic corespunzător, poate fi extras și izolat din celulele transformate. Numeroase proteine care participă la programarea ciclului celulelor sunt foarte puternic conservate aşa că mutantele ciclului celular al ciupercilor pot să fie complementare moleculelor umane cADN care pot fi clonate cu ajutorul vectorilor expresivi ai fibrelor ciupercilor. În concluzie, în acest mod, genele umane care induc reglarea proteică a ciclului celulelor pot fi repede izolate. Legătura între cele mai dezvoltate și cele mai puțin dezvoltate specii este în felul acesta încă o dată demonstrată.

Scanned with OKEN Scanner

Am insistat asupra derulării ciclului celular pentru că în detaliile legate de înmulțirea celulei se află o parte importantă a cunoștințelor necesare elaborării biotehnologiilor celulare sau genetice. Există o serie întreagă de alte cunoștințe ce ar trebui probabil însușite de specialiști. Ele se găsesc însă în tratatele și lucrările menționate în bibliografia acestei lucrări, de unde cititorul avizat și le poate extrage singur. Am dori însă să sugerăm adâncirea studiului legat de înmulțirea celulelor pe următoarele direcții:

a) **Maturarea oocișților, ca și mitoza celulelor somatice poate să fie stimulată de MPF.** Prin MPF trebuie să înțelegem un factor de promovare a maturării (maturation promoting factor, MPF). El se găsește în citoplasma ovulelor și *in vitro*, în absența progesteronului, stimulează maturarea oociților.

b) În embrionii foarte tineri ai ariciului de mare a putut fi identificată pentru prima dată ciclina mitotică. Aceasta este stimulată, de asemenea, de MFG. O anumită formă de ciclină, și anume ciclina B, s-a demonstrat în alte experiențe a fi o subsecvență a MPF. Exemplele ar putea continua, dar arată același lucru, și anume că biochimia ciclurilor celulare devine extrem de complexă pe măsură ce se avansează cu cercetările, scopul fiind același, al ordonării funcționării celulei și organismului spre țelul final, acela al supraviețuirii.

Cred că este necesar acum, la sfârșitul capitolului, să prezentăm o sinteză a sintezelor ciclului celular în figura 40.

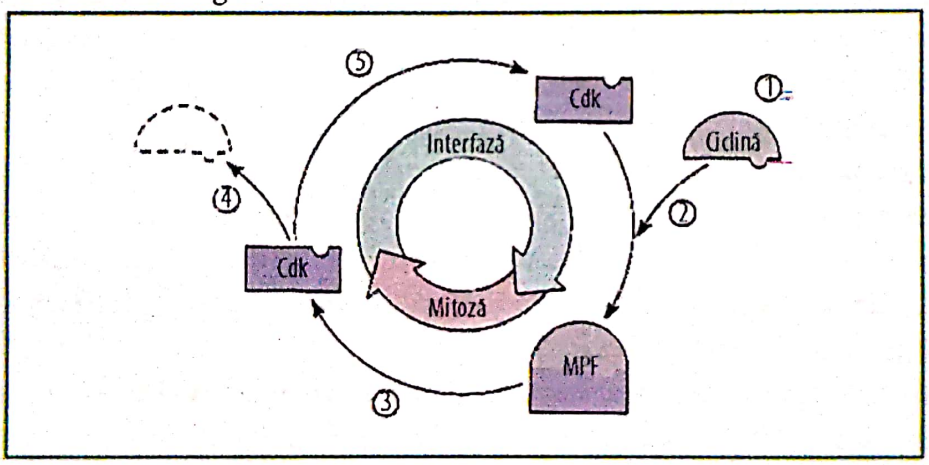


Fig. 40 – Relația dintre proteinchinază și coordonarea înmulțirii celulelor.
Fiecare pas, fiecare etapă a ciclului celulelor este coordonată pe perioada derulării ei pentru evitarea abaterilor ritmice ale activității în sine de către proteinchinaze. Acestea sunt enzime care fosforilează anumite proteine și prin aceasta le cuplează sau, dimpotrivă, le decuplează. Un comutator foarte important al mitozei este MPF (maturation promoting factor), un complex format dintr-o ciclină (un regulator proteic a cărui concentrație și-o schimbă ciclic) și o proteinchinază dependentă de ciclină (cdk).
(1)Ciclina este sintetizată de-a lungul întregului ciclu și se concentrează în interfază. La sfârșitul interfazei, ciclina se leagă de cdk și complexul proteic este inactivat (cdk este simultan fosforilat).
(3) MPF, în calitate de complex activ, coordonează mitoza prin fosforilarea diferitelor proteine, printre care și alte proteinchinaze (chinaze proteice).
(4) Una din proteinele activate de MPF este ocuzina, care descompune ciclina și deci MPF devine inactiv.
(5) Componentele cdk ale MPF sunt refolosite dacă se leagă din nou în interfază cu ciclina, ca un MPF reînnoit își recapătă activitatea sa chineazică (*Campbell A. Neil, 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

1.2.9. Celulele canceroase nu sunt supuse controlului ciclului celular

Celulele canceroase nu reacţionează normal la mecanismele de reglare ale organismului. Ele se înmulţesc foarte puternic şi supranumeric şi degenerează în alte tipuri de ţesuturi. Dacă nu se face nimic împotriva acestui fenomen, atunci ele pot distruge rapid întregul organism.

Cancerul nu apare numai la oameni, ci este prezent la numeroase grupe de animale, precum şi la diferite plante. Cercetările efectuate pe culturi de celule au demonstrat că acestea nu reacţionează la semnalele creşterii şi proliferării (înmulţire pe cale mitotică), care în mod normal ar conduce la starea de echilibru, de liniştire a creşterii.

Aşa cum deja s-a arătat (vezi fig. 36), ele continuă să se înmulţească fără a fi inhibate de densitate. Se înmulţesc în permanenţă şi haotic, suprapunându-se necontrolat până când substanţele nutritive ale mediului de cultură sunt complet epuizate.

Există, de asemenea, şi alte diferenţe între celulele normale şi cele de natură canceroasă care se regăsesc în deranjamente ale ciclului celular. Dacă celulele canceroase îşi ordonează diviziunea, acest lucru se realizează pe locurile preferate în ciclul celular şi nu exact la punctul de restricţie în FG_1. Pe de altă parte, celulele canceroase se înmulţesc nelimitat în cicluri, dacă li se oferă hrană continuu. Acest fenomen este denumit „potenţial nemuritor" sau „imortalizat". Aproape toate celulele normale ale mamiferelor se înmulţesc în culturi numai de 20-50 de ori, după care îşi încetează diviziunea, îmbătrânesc şi mor.

În organisme comportamentul anormal al celulelor canceroase poate conduce la catastrofe. Dificultăţile încep de îndată ce într-un ţesut o singură celulă este transformată (prin transformare se înţelege modificarea unei celule normale în una canceroasă). În mod normal asemenea celule degenerate sunt distruse de sistemul de apărare al corpului (imunosistem). Dacă însă celulele canceroase reuşesc să blocheze această maşinărie de distrugere, ele se pot înmulţi şi forma o tumoare, adică o masă de celule canceroase pe un ţesut altminteri sănătos (fig. 41).

Dacă celulele canceroase rămân la locul lor de formare se spune că avem de-a face cu o **tumoare benignă**, adică „cumsecade". Acest tip de tumori nu creează, de regulă, probleme grave şi pot fi eliminate printr-o intervenţie chirugicală. Celulele canceroase care se deplasează în ţesuturi şi organism formează tumori maligne (rele - supărate) şi în această situaţie putem spune că organismul, individul este bolnav de cancer.

Celulele canceroase maligne, pe lângă faptul că scapă regularizării controlului diviziunii celulare, sunt, din multe puncte de vedere, degenerate:

- Ele pot să deţină un număr nebănuit şi necontrolat de cromozomi.
- Schimbul de substanţe este deranjat.
- Nu mai îndeplinesc nici o funcţiune normală.
- Datorită modificărilor anormale ale suprafeţelor celulelor, ancorarea celulelor de cele vecine ca şi de matrixul extracelular nu se mai realizează şi, de aceea, ele pot uşor pătrunde în ţesuturile vecine unde formează tumori sau se pot elibera foarte uşor din tumori invadând sângele sau ţesuturile şi circuitele limfatice.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

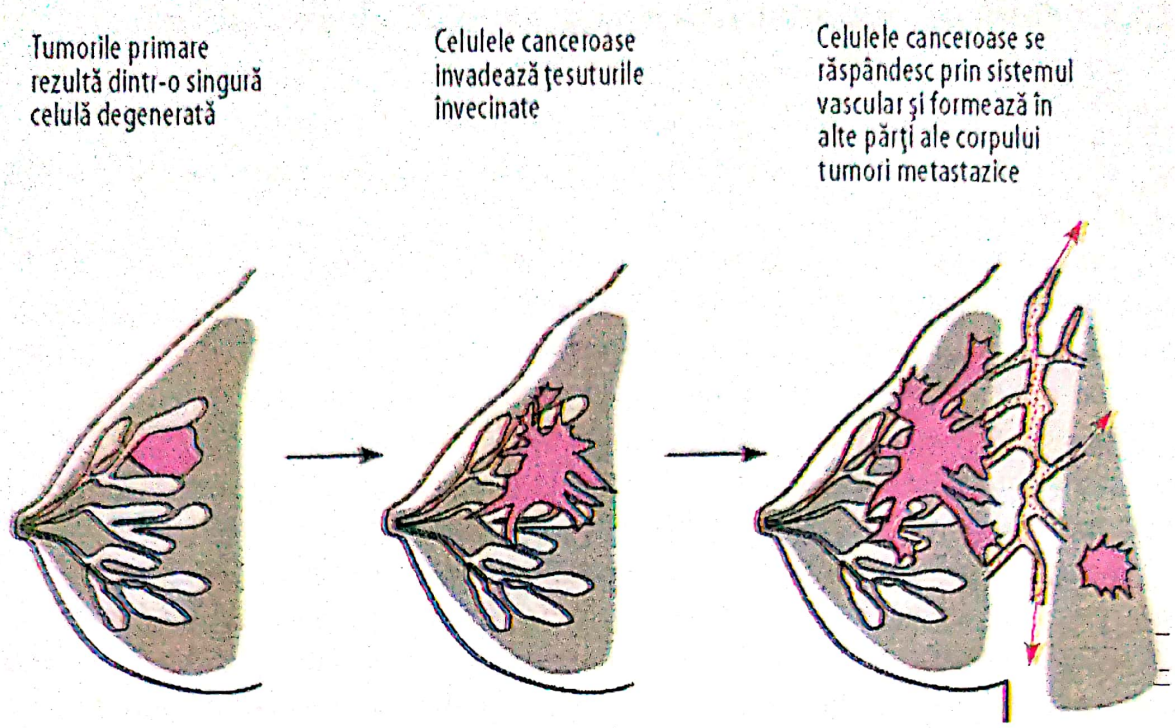


Fig. 41 – Creşterea şi metastazarea unei tumori canceroase la sân.
Celulele tumorii canceroase cresc necontrolat şi pot să se extindă în țesuturile vecine, iar prin circuitul vascular în alte părți ale corpului. Pornind de la o celulă la o tumoare primară prin dispersia celulelor canceroase se ajunge la aşa-numita metastază (*Beardbley T., 1994*)

Aşa cum s-a arătat în figura 41, această dispersie a celulelor canceroase departe de locul lor de formare, unde formează noi tumori, se numeşte **metastază**. Combaterea înmulțirii se face prin substanțe toxice, inhibitoare ale înmulțirii lor, metode însă foarte puțin eficace şi care cauzează şi efecte secundare dintre cele mai nedorite.

Astăzi se cunosc multe detalii şi în curând se vor cunoaşte şi mai multe asupra modului în care o celulă normală se transformă într-una canceroasă, degradată (N → C(D).

REȚINEȚI!

Cancerul poate avea deci mai multe cauze însă una dintre ele şi cea mai frecventă constă în **modificarea genelor care programează, coordonează înmulțirea celulelor.** Aşa cum se va vedea într-un capitol ulterior, cancerul este urmarea unei exprimări anormale a genelor care regularizează creşterea şi înmulțirea celulelor (*Campbel A. Neil, 2000*).

Celulele, elementele de bază ale vieții, structural şi funcțional ascund încă suficient de multe secrete pentru ca cercetătorii să fie ocupați până în viitorul îndepărtat cu aceste probleme.

În paginile următoare vom prezenta genele şi rolul lor în coordonarea sistemelor vii, a moştenirii şi transmiterii caracterelor.

2. GENELE

2.1. MEIOZA ŞI CICLURILE DEZVOLTĂRII SEXUATE

Principala însuşire a lumii vii este capacitatea organismelor de a se întoarce în permanenţă către propria lor specie.

Egalul creează egal (egal = egal). Numai din stejar apare stejar. Şi din elefant apare alt elefant. Nu s-a întâmplat încă în ultimii 10.000 ani de când omenirea a devenit conştientă de existenţa ei, ca **o maimuţă să devină om**, chiar dacă acceptăm teoria evoluţiei. Un om naşte tot un om, iar o maimuţă dă naştere tot la o maimuţă.

Continuarea, transmiterea caracteristicilor, a însuşirilor de la o generaţie la alta a căpătat denumirea de **moştenire** (sau transmiterea însuşirilor ereditare).

Întotdeauna însă, alături de însuşirile moştenite care sunt identice, întâlnim în permanenţă şi **variabilitatea**. Generaţia care vine îşi dezvoltă o anumită individualitate, aceasta înseamnă că fiecare vieţuitoare se deosebeşte întrucâtva în noul său tablou existenţial de părinţi, fraţi, surori, adică fiecare generaţie câştigă sau pierde ceva din baza de date a părinţilor şi rudelor sale. Nici măcar gemenii nu sunt identici, deşi în acest caz, cel puţin teoretic, identitatea ar fi trebuit să existe. Variabilitatea a intervenit şi aici într-un procent diferit 5-40% care îi diferenţiază pe gemeni unul de altul.

Aceste observaţii sunt efectuate de oameni deja de mai multe secole în scopul ameliorării plantelor sau a animalelor. Interesele privind conservarea identităţii moştenirii ca şi variabilitatea la oameni este la fel de veche. Mecanismele moştenirii asemănărilor ca şi variabilitatea au constituit pentru biologi până în momentele naşterii geneticii în secolul XX adevărate himere, simple presupuneri. Genetica, ca ştiinţă care se ocupă cu legile moştenirii şi ale variabilităţii organismelor, face obiectul substanţei acestui capitol. Veţi afla deci în ce măsură şi cum răspund astăzi biologii la întrebările legate de viaţă, întrebări care au fost puse de-a lungul întregului secol. Veţi face cunoştinţă cu descoperirile şi progresele genetice aduse altor domenii ştiinţifice de inspiraţie biologică, cum ar fi: fiziologie, biologie evoluţionistă, ecologie şi ştiinţe comportamentale. Veţi afla cum reuşeşte genetica să revoluţioneze industria farmaceutică, ca şi multe alte domenii tehnologice, dar în acelaşi timp veţi înţelege în ce măsură aceste cunoştinţe influenţează societatea umană şi o pune în faţa unor noi probleme etice şi filozofice.

În paginile imediat următoare ne vom ocupa în plan genetic cu problema legată de modul în care cromozomii părinţilor vor fi transmişi urmaşilor prin procesul de reproducţie. ■

2.1.1. Urmaşii primesc genele părinţilor şi moştenesc cromozomii

Prin moştenirea pe care urmaşii o primesc de la părinţi nu înseamnă deloc că vor avea parte de o asemănare 100%. Acest lucru, aşa cum se va vedea cu mult mai târziu în paginile acestei cărţi, va fi posibil prin tehnicile genetice ale clonării.

Părinţii îşi dotează urmaşii cu informaţii codate denumite „unităţi de moştenire" şi pe care specialiştii le numesc **gene**. După decodarea genomului uman cercetătorii

Scanned with OKEN Scanner

afirmă că oamenii moştenesc de la părinţii lor cca 40.000 gene. Toate împreună alcătuiesc **genomul uman**. Cedarea informaţiilor genetice de la părinţi către urmaşi este cauza, motivul pentru care există „asemănări" în familie. Genele constituie „computerul" care programează apariţia unor însuşiri de-a lungul timpului pe care noi oamenii le dezvoltăm apoi, de la fecundarea celulelor sexuale şi până la maturitate.

Genele reprezintă o **secvenţă, o anumită parte a unei molecule de ADN**. ADN-ul, aşa cum s-a văzut este un polimer format din 4 monomeri diferiţi, denumiţi nucleotide (sau nucleotizi).

În figura 42 prezentăm nucleotizii şi structura polimerului, iar în figura 43 prezentăm **dublu helix** (dublu elicoidal).

Pentru detalii asupra modului cum se formează proteinele-bază ale nucleotidelor nu ne îndoim că cititorul nostru interesat se va adresa unui tratat de biochimie. Ceea ce mai putem spune aici este faptul că polimerii ADN sunt nucleotide cu legături covalente denumite şi legături fosfo-dister plasate între fosfatul unui nucleotid şi structura zaharică (formată din 5 molecule) cu care se leagă consecutiv de următorii nucleotizi. ■

2.1.2. Compoziţia moleculară a genelor

O genă tipică are în lungimea sa mai multe sute de nucleotide, teoretic numărul de posibilităţi de baze azotoase fiind nelimitat. Importanţa unei gene pentru celulă este dată de înşiruirea specifică a celor 4 baze, care conduc la codarea informaţiei.

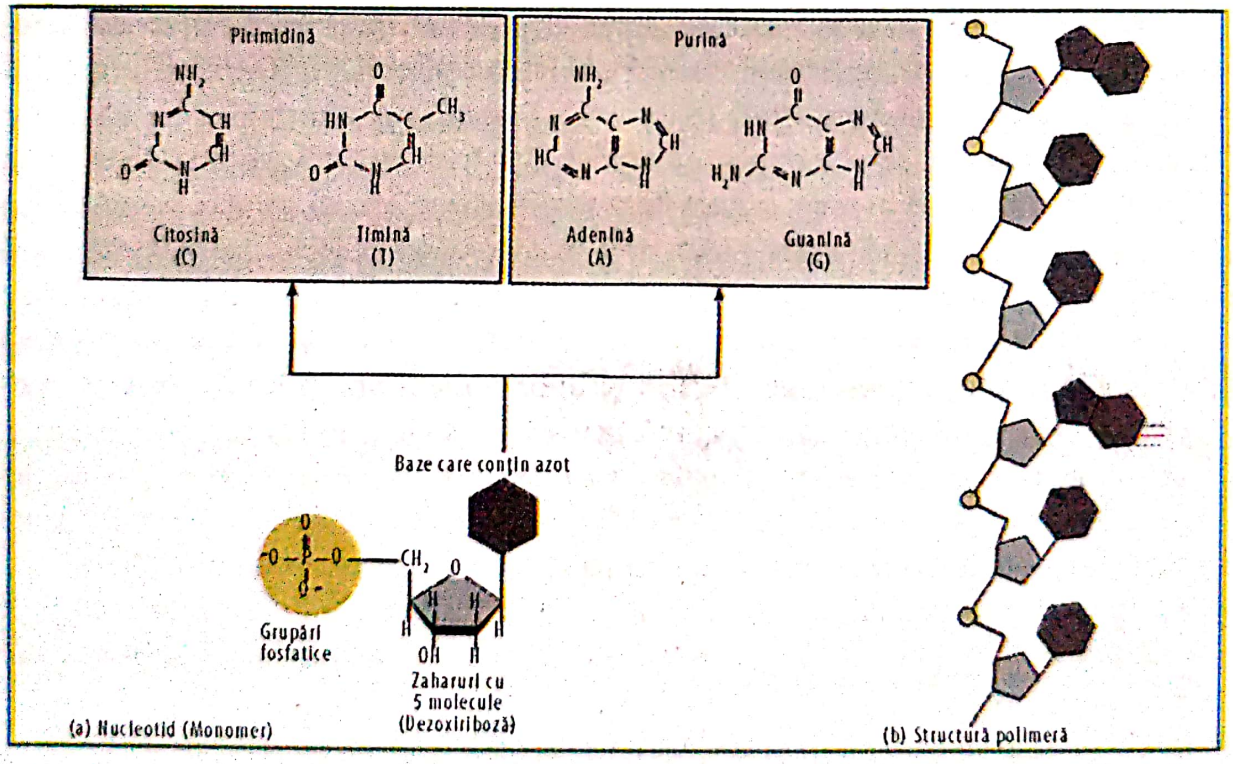


Fig. 42 – Structura nucleotidelor şi a ADN-ului ca polimer.
a) Nucleotidele (nucleotizii) sunt monomeri ai acizilor nucleici, care rezultă din 3 molecule de bază mai mici: o grupare fosfatică, o pentoză zaharică şi o bază care conţine prioritar azot (purină sau pirimidină). În ADN, pentoza este denumită dezoxiriboză, iar posibilele baze azotoase sunt citosină, timină, adenină sau guanină.
b) În funia ADN (dreapta), fiecare monomer nucleotidic este legat de următorul prin gruparea sa fosfatică şi dezoxiriboză. Polimerul conţine deci o coloană zahăr-fosfat, cu diferite grupări ale celor 4 baze azotoase cuplate pe ea.

Scanned with OKEN Scanner

Construcţia moleculară a unei secvenţe de ADN este prezentată în figura 43. Pe fond acest schelet prezintă modul în care sunt aşezate bazele azotate pe coloana ADN şi mai ales modul cum sunt legate ele de coloana zahăr-fosfat.

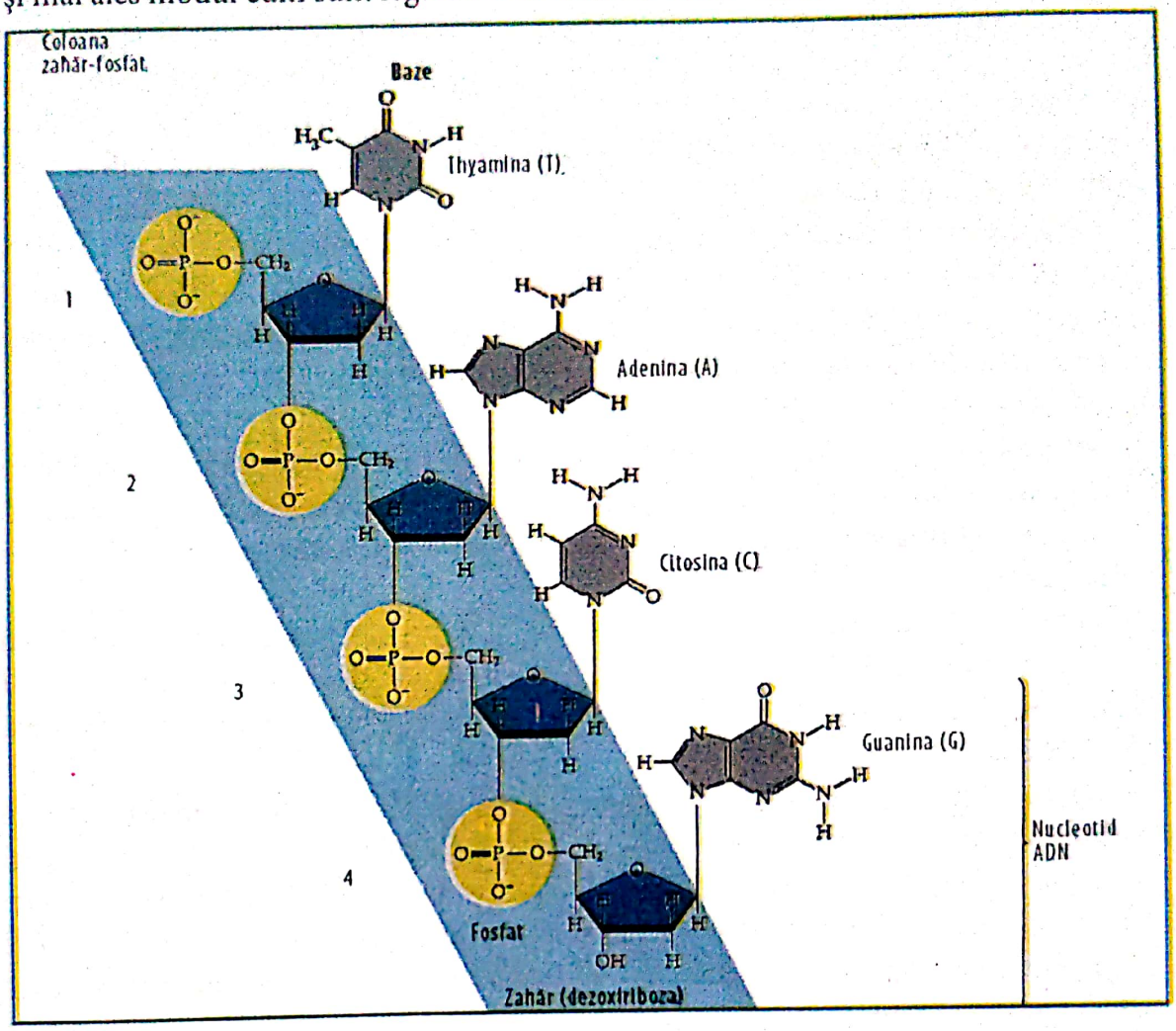


Fig. 43 – Construcţia moleculară a unei coloane AND.
Fiecare nucleotid al unei verigi polinucleotidice este alcătuit dintr-o bază care conţine azot (T, A, C şi G), un polimer zaharat - dezoxiriboza şi o grupă fosfat. Grupa fosfat a unui nucleotid se leagă de grupa zaharată a nucleotidului următor. În felul acesta, rezultă un fel de coloană vertebrală, în care fosfatul şi zahărul alternează. În plus, fiecare moleculă polizaharidă este legată de o bază azotoasă prin ionul de hidrogen (*prelucrare diferiţi autori, baza, Campbell, 2000*)

După ce ADN-ul a fost acceptat ca material genetic, s-a declanşat o adevărată competiţie între numeroase laboratoare genetice, toate încercând să descopere modul în care structura acestuia îşi îndeplineşte funcţiile ereditare.

În anii '50 au fost puse la punct modalităţi în care monomerii sunt aşezaţi în interiorul unor molecule de acizi nucleici prin legături covalente (fig. 43). În acest moment începe a doua mare competiţie pentru descifrarea structurii tridimensionale a ADN-ului. Ea a fost câştigată de cercetătorul american James Watson şi englezul Francis Criek, care au construit modelul ADN prin calcule, cât şi de Rosalind Franklin, care a fotografiat prin sistemul Röntgen o secvenţă de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatul conjugat al cercetărilor a condus la concluzia că formele curbate ale benzilor ar putea crea o structură a ADN-ului în forma unor benzi elicoidale, al căror diametru ar fi de 2 nanometri (nm).

Conform calculelor efectuate de specialiştii mai sus citaţi, bazele azotoase sunt aşezate una faţă de alta la 0,34 nm (fig. 44). Ţinând cont de diametrul helixului, ar trebui să avem de-a face cu două benzi, ceea ce s-a demonstrat apoi ştiinţific de Linus Pauling prin fotografiere, molecula de ADN astfel descoperită căpătând denumirea de **dublu helix** (dublu elicoidal).

Revăzând acum figura 43, constatăm că, de fapt, în construcţia secvenţei ADN avem de-a face cu două coloane distincte. Coloana zahăr-fosfat, în care fosforul se leagă printr-un oxigen de molecula polizaharată, are la bază dezoxiriboza. Întreaga coloană zazăr-fosfat este legată covalent de bazele azotate prin intermediul unor punţi de hidrogen (fig. 44).

Bazele azotate sunt aşezate în aşa fel încât ele joacă un rol major în înmagazinarea informaţiei. Adenina şi guanina sunt purine, adică baze azotoase cu 2 cicluri organice, în timp ce citosina şi timina aparţin familiei pirimidinelor formate dintr-un singur ciclu organic.

Dacă s-ar cupla două purine (A şi G) ar forma un complex proteic de 2 ori mai mare decât două pirimidine (C şi T). Deci, o pereche purină-purină este prea lată, iar o pereche pirimidină-pirimidină este prea îngustă pentru a stimula formarea unui ADN de 2 nm.

Soluţia rămâne aceea a cuplării în pereche a unei purine cu o pirimidină care să conducă la lăţimea solicitată de diametrul structurii dublu helix. Perechile vor fi deci de forma A - T şi G - C. Fiecare bază îşi alege acele grupe chimice, parteneri reali cu care îşi construiesc punţile de hidrogen. Adenina în cuplu cu timina formează şi se leagă prin două punţi de hidrogen în timp ce guanina şi citosina formează şi se leagă prin 3 punţi de hidrogen (vezi desenul şi fig. 44).

Modelul Watson-Criek explică şi regula lui Chargaff conform căreia „dacă o bandă de ADN conţine un „T" atunci cu siguranţă vizavi în banda a doua se află un „A", iar un „G" într-o bandă induce un „C" în banda a 2-a". Acest lucru presupune şi demonstrează cel puţin logic că în acelaşi organism există o frecvenţă şi greutate egală a adeninei şi timinei, molecule mai uşoare şi o frecvenţă şi greutate egală a guaninei şi cistinei, molecule mari. Logic este, de asemenea, ca frecvenţa să fie egală pentru toate cele patru baze azotoase. După publicarea în revista engleză „*Nature*" a unei singure pagini despre acest subiect, un subiect fierbinte care descria noua moleculă de ADN sub forma dublu helix (dublu elicoidal), această descoperire a devenit un simbol al **biologiei moleculare.**

Dacă revenim la figura 43, observăm o secvenţă ADN formată din patru **nucleotizi** conţinând toate cele 4 baze. Un **nucleotid** este o legătură prin punţi de hidrogen (2 sau 3) aşa cum s-a văzut dintre o bază azotată, dezoxiriboză şi fosfat. Adică o legătură ADN completă în care sunt prezenţi toţi cei 4 atomi ai vieţii N.C.O.H. la care se adaugă fosforul, cel care contribuie în legăturile sale organice la reglarea reacţiilor

Scanned with OKEN Scanner

energetice ale organismului. Un nucleotid ADN mai capătă denumirea de **motrice** atunci când se judecă în componența unei gene sau a unui cromozom. Mai este denumit și **cărămida de bază** a ADN-ului.

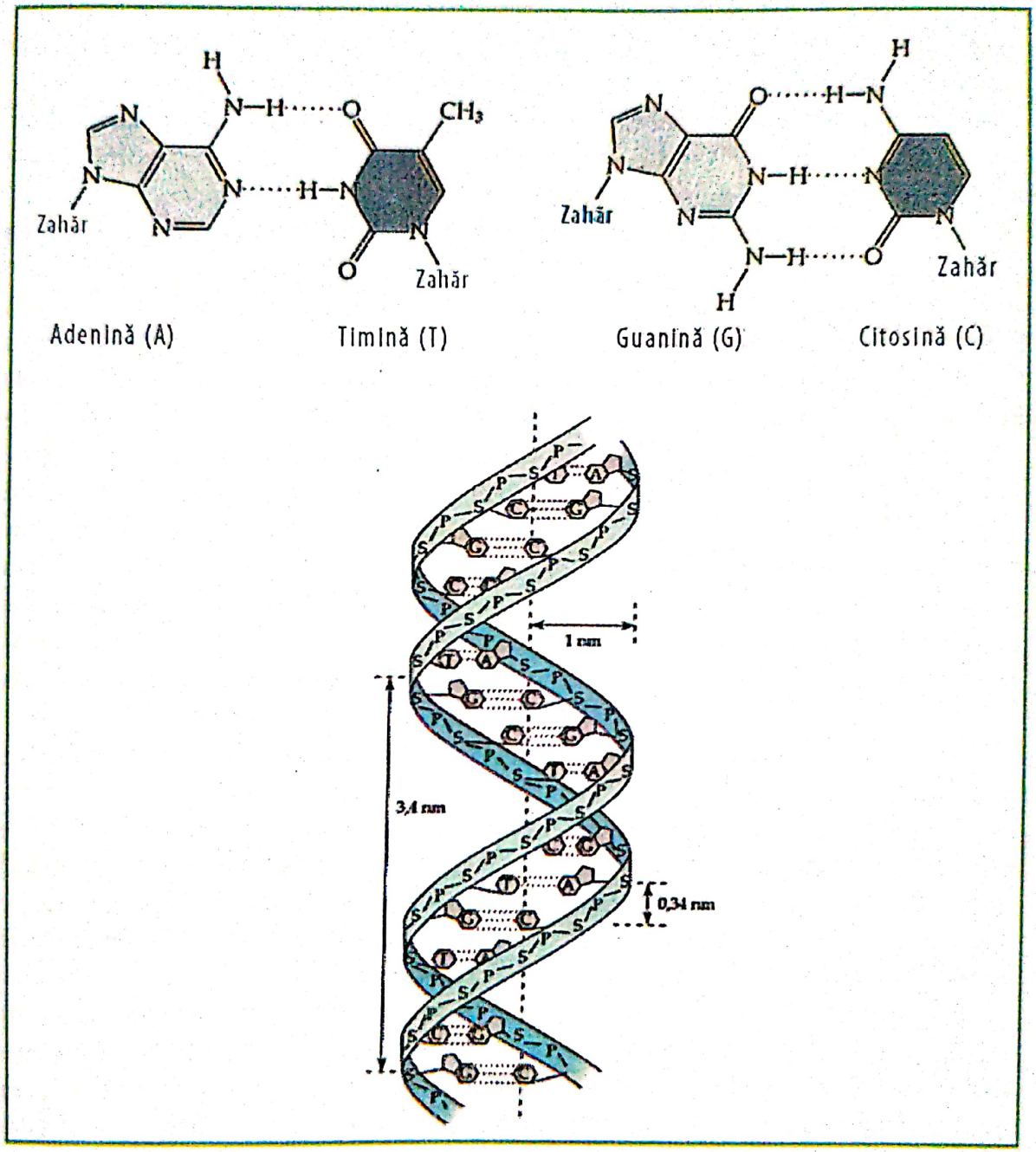


Fig. 44 – Dublu helix.
Molecula de ADN este alcătuită din două funii (benzi), la care coloana zahăr-fosfat a polimeleidelor (prezentată în albastru în figură) este indicată pe partea exterioară a helixului. În partea interioară se află perechi de baze azotoase care mențin fixe cele două benzi prin punți de hidrogen. Formarea punților de hidrogen între baze este specifică și nicidecum la întâmplare. De exemplu, adenina (A) poate forma pereche numai cu timina (T), în timp ce guanina (G) numai cu citozina (C). În timp ce o celulă se pregătește pentru diviziune, cele două benzi (funii) ale dublu helixului se separă și fiecare servește ca „matriță" pentru o ordonare a nucleotidelor în vederea formării unei benzi complementare (*după Campbell A. N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

Gena este formată din minimum 4 nucleotizi şi poate ajunge până la sute de combinaţii. Cromozomul, la rândul lui, este format din cel puţin 2000 de gene, mai multe da, mai puţine, teoretic, nu. Anticipând o definiţie a genei despre care se va vorbi mai departe putem afirma că o genă este o secvenţă de ADN utilizată pentru fabricarea unei molecule de ADN. Definiţia porneşte de la realitatea moleculară că fiecare ADN conţine informaţia codată pentru producerea ARN, tARN şi snARN.

Orice altă formă de existenţă a structurii moleculare presupune existenţa unor modificări spontane sau induse, care apar îndeosebi pe molecula de guanină şi care aşa cum se va arăta în viitor, se numesc mutante sau mutaţii.

Informaţia ereditară, cea care se moşteneşte, se predă urmaşilor prin modul divers în care nucleotidele genei sunt aşezate pe benzile acesteia. Această aşezare seamănă foarte mult cu informaţia pe care o primim atunci când ea vine din paginile scrise ale unei cărţi (vezi figura 45). Creierul uman, citind literele, transformă cuvintele şi propoziţiile în tablouri, viziuni, presupuneri. Dacă, de exemplu, citim propoziţia „mărul este sursă de vitamine", niciodată un creier sănătos n-o să-şi imagineze că, de exemplu, „măgarul este o sursă de vitamine" sau altceva. Exact aşa se întâmplă şi cu celulele. Ele vor traduce „propoziţiile" genetice în însuşirile care se moştenesc (pistruii de la tată sau ochii albaştri de la mamă etc.) De regulă însă nu toate caracteristicile părinţilor se transmit la urmaşi. Combinaţiile dintre diverse nucleotide pe genă sunt, conform „teoriei probabilităţilor", extrem de numeroase, de ordinul a miliarde de posibilităţi, ceea ce exprimă în egală măsură şi posibilitatea extrem de diversă a lumii vii, adică biodiversitatea. Cele mai multe gene însă programează celula pentru sinteza anumitor enzime şi alte proteine şi apoi, prin acţiunea comună şi interspecifică a acestora, se ajunge la sublinierea anumitor însuşiri ereditare.

Baza chimică a eredităţii o constituie multiplicarea exactă a ADN-ului care conduce la copiile genetice fabricate, prin care părinţii îşi transmit caracterele urmaşilor.

Transmiţătorul acestor gene la oameni îl constituie celulele sexuale, respectiv spermatozoidul şi ovulele. După unirea acestor celule care conţin genele ambilor părinţi apare embrionul. Construcţia unei structuri ordonate care să cuprindă programul de transmitere ereditară a caracterelor în forma unui ADN specific este una din cele mai importante teme care preocupă azi cercetarea biologică.

ADN-ul unei celule eucariotice este repartizat în anumiţi cromozomi, care sunt localizaţi în nucleul celulei. Fiecare specie are numărul său caracteristic de cromozomi - setul de cromozomi la om este de 46 (în celulele sexuale se găsesc 23 aşa cum am văzut deja anterior). Fiecare cromozom este format dintr-o singură moleculă ADN, care este cu mult mai lungă decât cromozomul. Cu ajutorul anumitor proteine, ADN-ul este pliat foarte complicat şi bobinat (înfăşurat) până se obţine structura şi forma tipică a cromozomului. Un cromozom conţine sute sau mii de gene, fiecare dintre ele ocupând o anumită zonă pe molecula de ADN. Poziţia unei gene pe un anumit cromozom este denumită locus.

Mecanismele eredităţii, prin care se moştenesc gene de la părinţi la urmaşi se corelează strâns cu distribuţia cromozomilor în celulele sexuale. Conformaţia noastră genetică, patrimoniul nostru genetic, depinde de **felul şi calitatea genelor** care se află pe cromozomi şi pe care îi primim de la ambii părinţi. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.1.3. Replicarea ADN-ului

Replicarea presupune multiplicarea, copierea ADN-ului existent sub formă de benzi elicoidale, benzi care, prin perechile de baze azotoase, servesc drept „**matriţe**" pentru noile benzi complementare. Raporturile între structura şi funcţiunile celei mai importante teme a biologiei moleculare zac în formidabila existenţă a dublu helixului. În arhitectura ADN-ului se află cheia mecanismului de copiere a genelor (fig. 45).

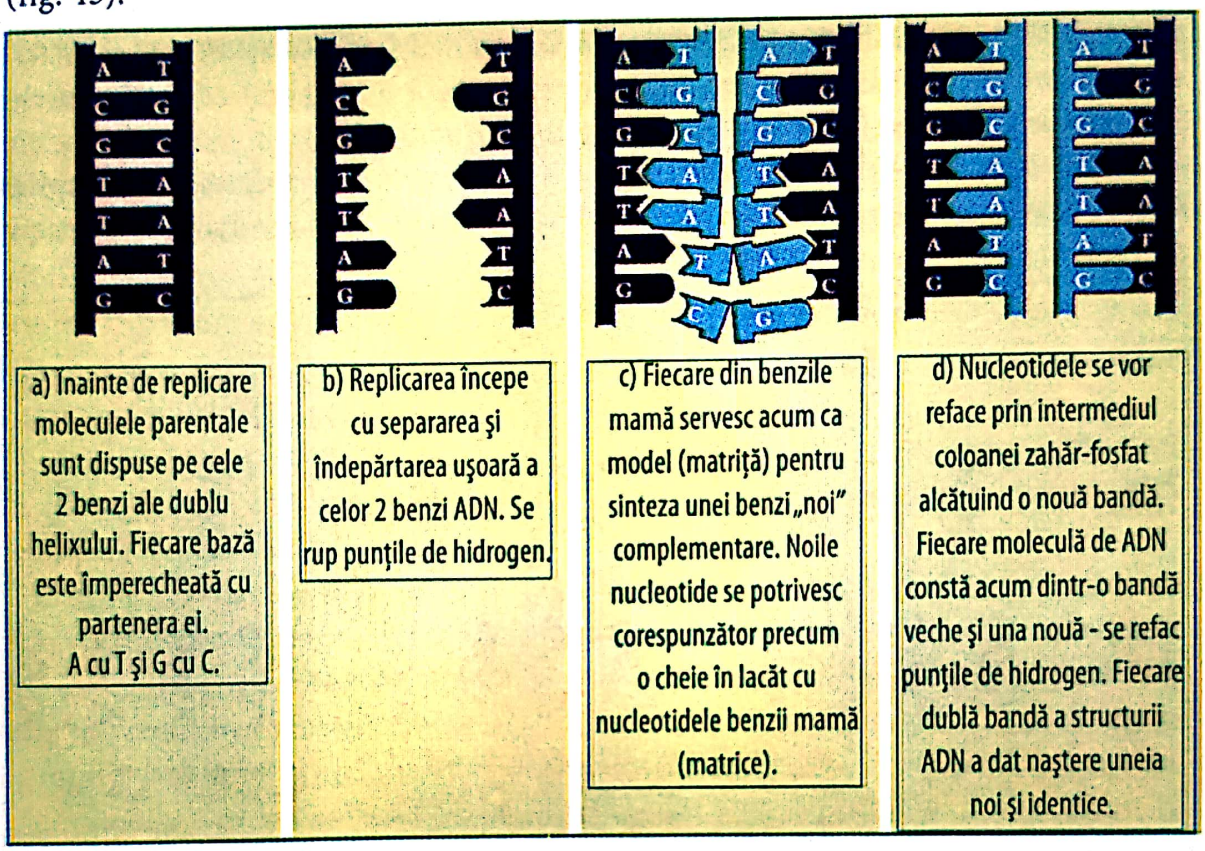


Fig. 45 – Replicarea ADN - principiul de bază.
Figura de mai sus prezintă replicarea ADN-ului într-o formă extrem de simplificată. Dublu helix este prezentat aici sub formă de bandă. Dintr-un dublu helix rezultă practic două. Tulpina principală este menţinută de coloana zahăr-fosfor, iar lăstarii acesteia sunt bazele azotoase perechi (A.T.C.G.). ADN-ul de pornire (matrice) este colorat în albastru închis, iar cel nou, care apare, în albastru deschis (*după Campbell A. Neil, 2000*)

După ce am pus în evidenţă principiul şi mecanismul replicării ADN pentru biotehnologiile moleculare, este interesant a se cunoaşte cum reuşeşte o celulă să-şi copieze informaţia sa practică pentru că aşa cum au afirmat Watson şi Crick, încă din 1953*, materialul genetic poate fi copiat şi transmis de la o celulă la alta.

Să ne amintim regula împerecherii bazelor azotoase care afirma că fiecare bandă a ADN-ului cuprinde acelaşi număr de baze cu diferenţa că faţă în faţă sunt 2 baze compatibile care se leagă între ele prin punţi de hidrogen. Aceasta înseamnă că cele 2

* Watson J.D şi F.M.C. Crick - Molecular structure of Nucleic Acids. A Structure of Deoxynucleic Acids in Nature 171/1953/pag. 738.

Scanned with OKEN Scanner

benzi sunt „complementare", fiecare deţinând informaţia necesară **sintezei celeilalte**. Dacă o secvenţă nucleică purcede la duplicarea unei molecule de ADN, atunci cele două benzi se separă aşa cum am văzut, fiecare dintre ele servind ca matriţă pentru ordonarea nucleotizilor din banda complementară.

În acelaşi timp, conform regulii perechilor de baze, ambele benzi matrice sunt copiate. Anumite enzime leagă un nucleotid de altul şi aşa apare o nouă bandă pe structura ADN. Mecanismul de copiere este analog unui clişeu negativ şi o fotografie ce rezultă din acesta. După fotografie poate fi făcut un nou clişeu negativ şi lucrurile se pot derula aşa la infinit. Modelul teoretic expus mai sus de Watson şi Crick a fost denumit **model semiconservativ**. El se caracterizează prin faptul că noul material replicat conţine o bandă veche (matricea) şi una nouă (replica).

Alte ipoteze ale replicării ar fi fost cel conservativ prin care ar fi trebuit ca **replica să fie identică cu matricea** şi ipoteza modelului dispersiv în care materialul genetic nou s-ar fi amestecat cu cel vechi (fig. 46).

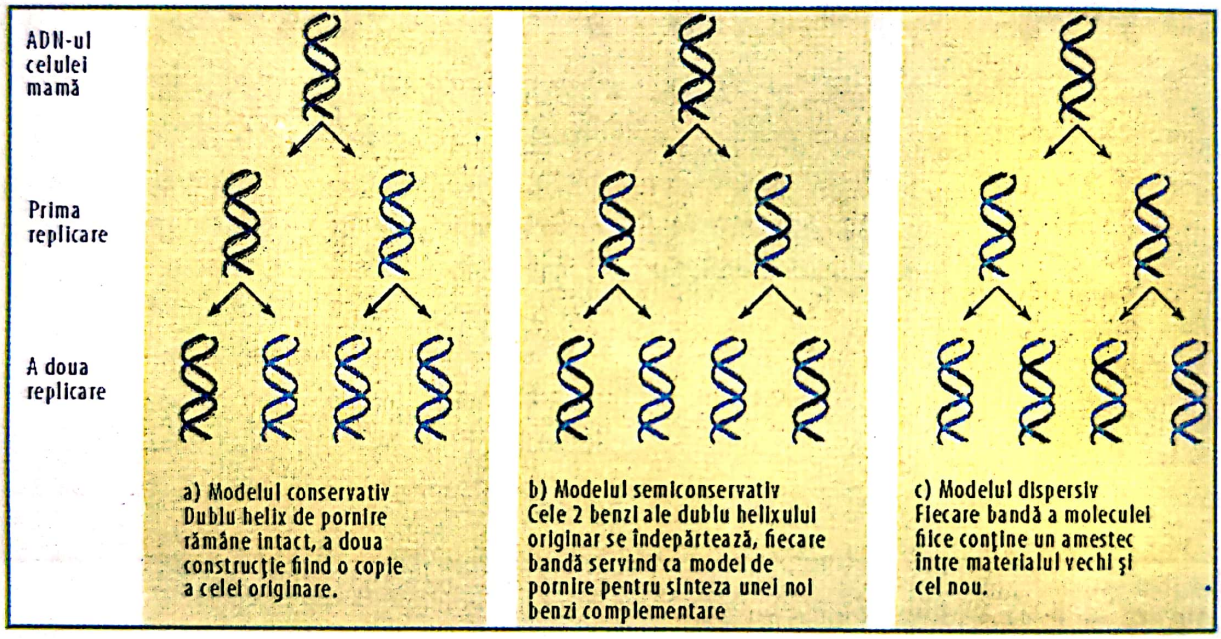


Fig. 46 – Trei modele ipoteză ale replicării ADN-ului.
Fără a intra în alte detalii, afirmăm că studiile de laborator foarte elaborate întreprinse către sfârşitul anilor '50 de către Mathew Meselson şi Franklin Sthal au dus la concluzia indubitabilă că modelul semiconservativ elaborat teoretic de cei doi în 1953 este singurul care susţine replicarea ADN-ului, celelalte 2 ipoteze prezentate fiind infirmate experimental (*Campbell A. Neil, 2000*)

Aşadar procedeul de copiere a materialului genetic este teoretic extrem de elegant şi simplu. În realitate, procesul solicită totuşi o biochimie foarte complicată. Despre acest lucru vom vorbi însă de o manieră foarte sintetică. ■

2.1.4. Enzimele şi alte proteine conduc procesul de replicare a ADN-ului

Este interesant să aducem câteva informaţii utile celor care studiază acest material în vederea unei bune pregătiri în domeniul biologiei moleculare, că una din cele mai simple procariote, bacteria *E. coli* deţine un singur cromozom format din 5 milioane

Scanned with OKEN Scanner

de perechi de baze şi care în mai puţin de 1 oră poate să-şi dubleze ADN-ul în 2 celule genetic identice.

Fiecare din celulele corpului uman conţin 46 molecule ADN, o moleculă imensă de ADN pentru fiecare cromozom. Aceasta conduce la faptul că **fiecare celulă umană conţine circa 6 miliarde perechi de baze, adică de peste 1000 ori mai mult decât o celulă bacteriană.** Dacă fiecare bază este scrisă cu literele A, G, C şi T în formă de propoziţii şi apoi tipărite, ar fi nevoie de peste 1000 de cărţi a câte 1500 pagini pentru fiecare celulă. Vă puteţi imagina de cât timp ar avea nevoie omenirea pentru a descrie în cărţi întregul **proiect al genomului uman** despre care vom vorbi în detaliu în această lucrare. Cu toate acestea, o celulă umană are nevoie de câteva ore pentru a copia acest volum imens de informaţie şi acest lucru se face cu extrem de puţine erori: mecanismul de copiere al informaţiei genetice este din punct de vedere al vitezei de copiere şi al exactităţii acesteia atât de frapant încât nici pe departe nu se apropie de tehnica informaţională de azi, o celulă fiind mai rapidă şi mai exactă în derularea acestei operaţiuni decât peste 10.000 de computere care deservesc astăzi Pentagonul. Nimic din ce a realizat omenirea din punct de vedere tehnologic nu se aseamănă ca viteză şi exactitate cu ceea ce realizează natura astăzi.

Un număr de peste 10 enzime şi alte proteine participă la replicarea ADN-ului. Se cunoaşte mult mai mult despre acest mecanism la procariote, dar fenomenul se aseamănă foarte mult şi la eucariote.

Despre modul cum se dă startul în replicare este de reţinut faptul că acesta începe ca la **startul atletic** dintr-un **loc de pornire specific.** Proteinele ajutătoare se leagă de acel loc, îndepărtează benzile prin formarea unei vacuole de replicare. De la această „băşică", replicarea porneşte în ambele sensuri. Spre deosebire de bacterii, la om se formează sute sau mii de locuri de pornire, adică mii de băşici de replicare care apoi se unesc de-a lungul moleculei îndepărtând benzile ADN-ului. Către coada băşicii de replicare se formează un fel de furculiţă de replicare în formă de „Y", zonă în care pot fi prelungite benzile ADN.

Cum se face această prelungire a benzilor ADN?

Procesul are loc printr-o catalizare cu ajutorul unor enzime, enzime denumite ADN- polimerază. Nucleotidele existente se leagă de nucleotidele vii, complementări ale benzii matriceale şi cu ajutorul enzimei în cauză se leagă nucleotid de nucleotid până se formează o nouă bandă. Viteza alungirii ADN-ului se face cu 500 nucleotide/ secundă la bacterii şi 50 nucleotide/secundă în celulele umane. Substratul ADN-polimerază nu constă numai din nucleotide, ci şi din legături apropiate denumite nucleotid-trifosfaţi (fig. 47).

În locul unei singure grupe fosfat, nucleotid-trifosfatul conţine evident 3 grupe fosfat, căci ATP-ul este şi el un nucleotid-fosfat. Singura diferenţă între ATP şi adenozin-trifosfatul implicat în replicarea ADN constă în faptul că la dezoxi-ATP componentele zahăr sunt diferite. ATP-ul conţine riboză în timp ce dezoxi-ATP conţine dezoxiriboză.

Scanned with OKEN Scanner

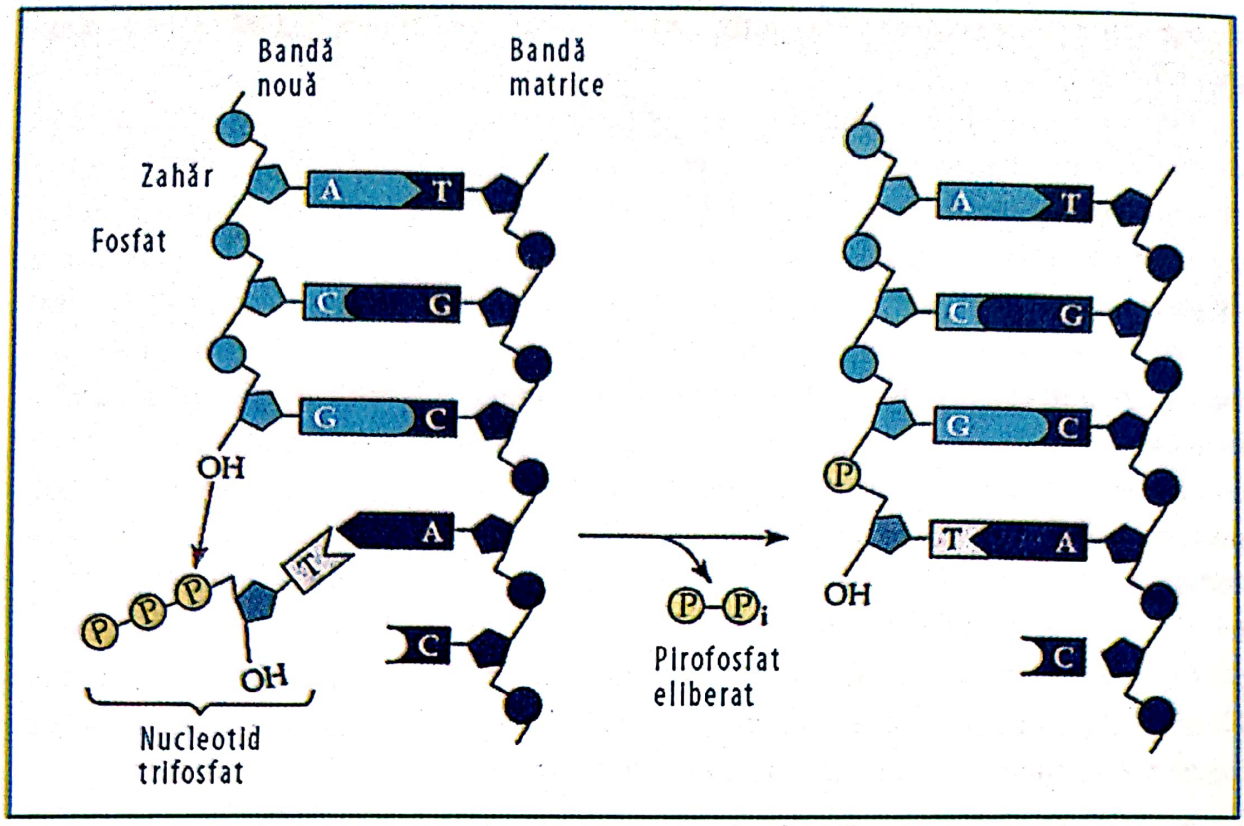


Fig. 47 – Includerea unor nucleotide în banda ADN.
La depozitarea unor nucleotizi-trifosfaţi pe coloana zahăr-fosfat a unei benzi ADN în creştere, două din resturile sale de fosfaţi sunt separate ca molecule pirofosfatice. Enzima ADN-polimerază catalizează această reacţie, cu preluarea energiei din hidroliza legăturilor între grupele fosfatice (*Campbell A. Neil, 2000*)

Ca şi în cazul ATP, monomerii ADN „dezoxi-nucleotid-trifosfaţii" sunt chimic reactivi deoarece grupele lor fosfatice au încărcături negative, respingându-se reciproc. Dacă acum un monomer (nucleotid) se află în zona finală a benzii, în prezenţa celor 2 grupe fosfat are loc hidroliza acestora, o reacţie exergonică care antrenează polimerizarea nucleotidului la molecula de ADN. Astfel se lungeşte banda ADN. Ţinând cont de faptul că benzile de ADN sunt antiparalele, lucru de care nu trebuie să uităm, ADN-polimerază poate să lege un nucleotid numai pe poziţia 3'- final un nou nucleotid şi nicidecum pe poziţia 5'-final, conform numerotării internaţionale a atomilor de carbon în dezoxiriboze. ■

2.1.5. Cum începe sinteza ADN

Cunoaştem deja că sinteza ADN-ului constă dintr-o polimerizare a nucleotizilor. Un nucleotid nou nu se poate forma decât pe un loc deja prestabilit pe banda ADN, iar acesta trebuie să se formeze ca o pereche a unuia deja existent. În figura 48 este prezentat acest fenomen extrem de interesant.

Ca urmare a acestui proces, se poate afirma că polimerizarea ADN-ului ajută, promovează sinteza noului ADN **dar nu o iniţiază**. Noul nucleotid va fi fixat de către polimeraza ADN la finele unei scurte benzi existente deja. Acest scurt segment a fost

Scanned with OKEN Scanner

denumit **primer** sau **starter** . El nu este format din ADN ci dintr-un scurt fragment de ARN, adică un alt tip de acid nucleic. In primer domină de aceea aşa-numitele oligo-nucleotide.

O nouă enzimă denumită **primază** contribuie la construcţia nucleotizilor ARN şi la asamblarea lor în segmentul denumit primer. Primerul în cazul eucariotelor este format din 10 nucleotide. ADN-polimeraza are nevoie de un singur primer pentru a sintetiza noul nucleotid şi a-l fixa pe locul său. Pentru fabricarea noii benzi procesul de sinteză foloseşte fiecare din fragmentele Okazaki care alcătuiesc un primer.

Un alt tip de ADN polimerizat înlocuieşte nucleotidele ARN ale primerului prin nucleotide corespunzătoare tip ADN. Enzima **ligază** leagă fragmentele ADN şi formează noua bandă.

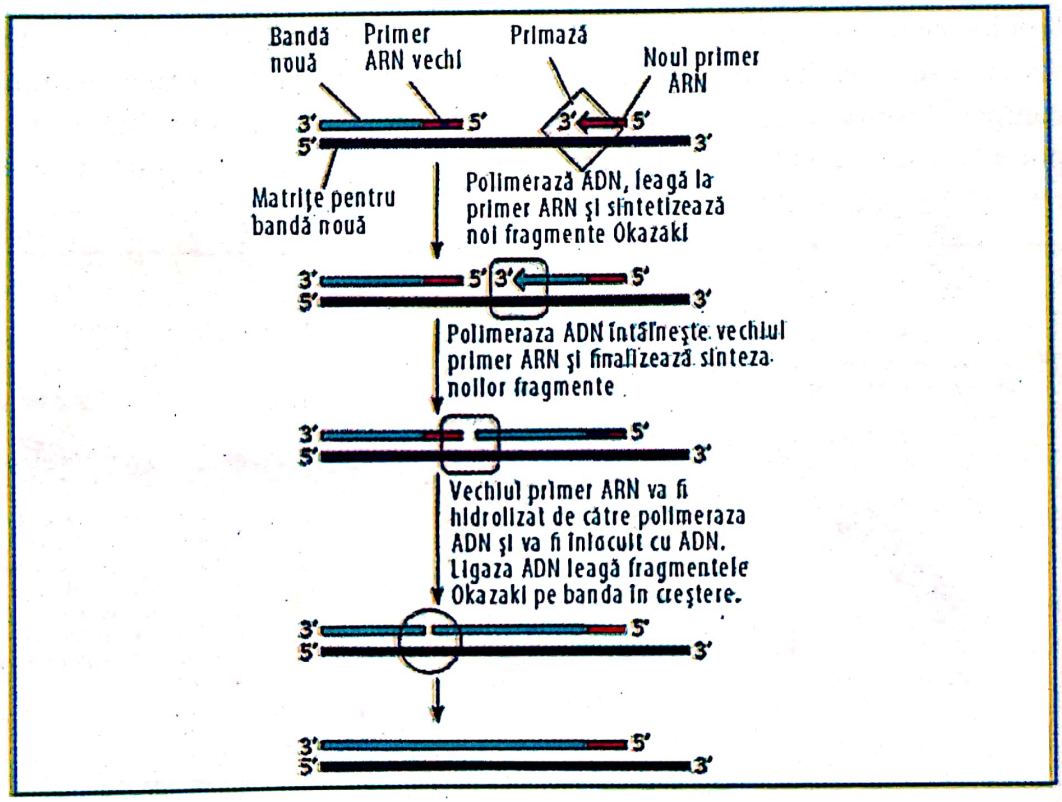


Fig. 48 – Polimeraza ADN.
Polimeraza nu poate să înceapă sinteza unui nucleotid. Ea poate să cupleze un nou nucleotid în poziţia finală 3 a unei benzi deja existente. Primerul este un oligonucleotid scurt alcătuit din elemente ARN şi este sintetizat de către primază, o enzimă care conduce la polimerizarea ARN-ului. Degradarea hidrolitică a primerului şi înlocuirea lui cu elemente ADN urmează datorită unei alte polimerizări ADN. Enzima polimerizatoare este polimeraza I la *E. coli* pentru înlocuirea elementelor ADN şi polimeraza III pentru prelungirea benzii ADN (*Albert B. şi colab., 2004; Campbell A. N., 2000*)

2.1.6. Alte proteine implicate în procesul de replicare al ADN

Este bine să ne reamintim că până în prezent în procesul de replicare a ADN-ului am cunoscut 3 tipuri de enzime şi anume:

- polimerazele ADN;
- ligazele;
- primazele.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările au demonstrat însă că există numeroase alte proteine implicate în procesul de replicare. Cele mai cunoscute două sunt următoarele:

Helicasa - este o enzimă care atacă la punctul de ramificare al furcii de replicare cu scopul de a separa bazele azotate perechi.

În felul acesta se realizează decuplarea, separarea celor două benzi (funii) ale dublu helixului. Ele seamănă practic cu cele două părți ale unui fermoar.

Pentru ca cele două benzi, funii de ADN, să nu se reunească, acestea se cuplează urgent cu proteinele de construcție a benzii (P.C.B.) - în engleză SSB-Proteine. Cu ajutorul helicasei și a proteinelor deja cuplate în zona locală a benzilor despărțite începe dezvoltarea unor noi molecule de ADN (fig. 49). Cu cât ne apropiem mai mult de furca de replicare, ADN-ul este în continuare smuls, ceea ce conduce la probleme topologice importante. De exemplu, până la sfârșitul anilor '70 era complet necunoscut cum se poate întâmpla ca la *E. coli*, helixul-ADN, în decursul a 20 minute, să fie complet despiralat, replicat și din nou respiralat. Calculele au arătat că, pentru a se putea înfăptui acest lucru viteza de rotație a ADN-ului în jurul propriei sale axe ar fi trebuit să fie de 20.000 rotații/minut.

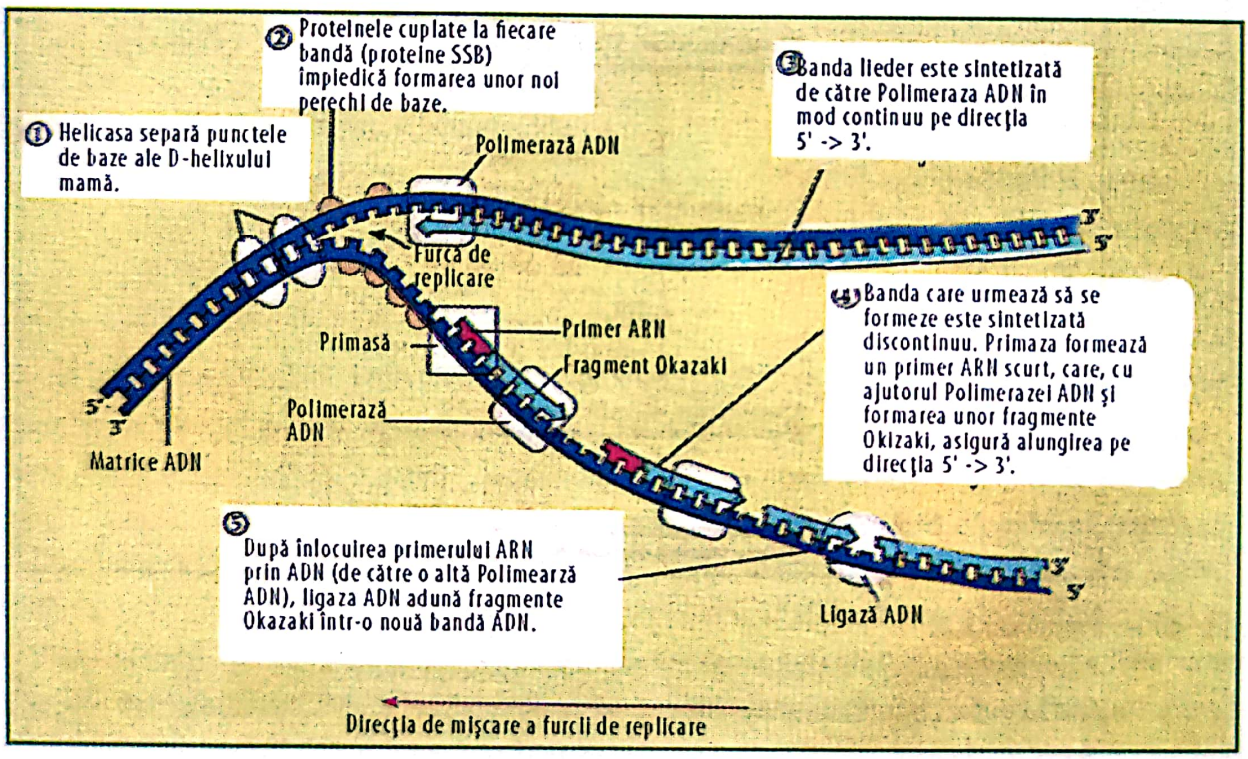
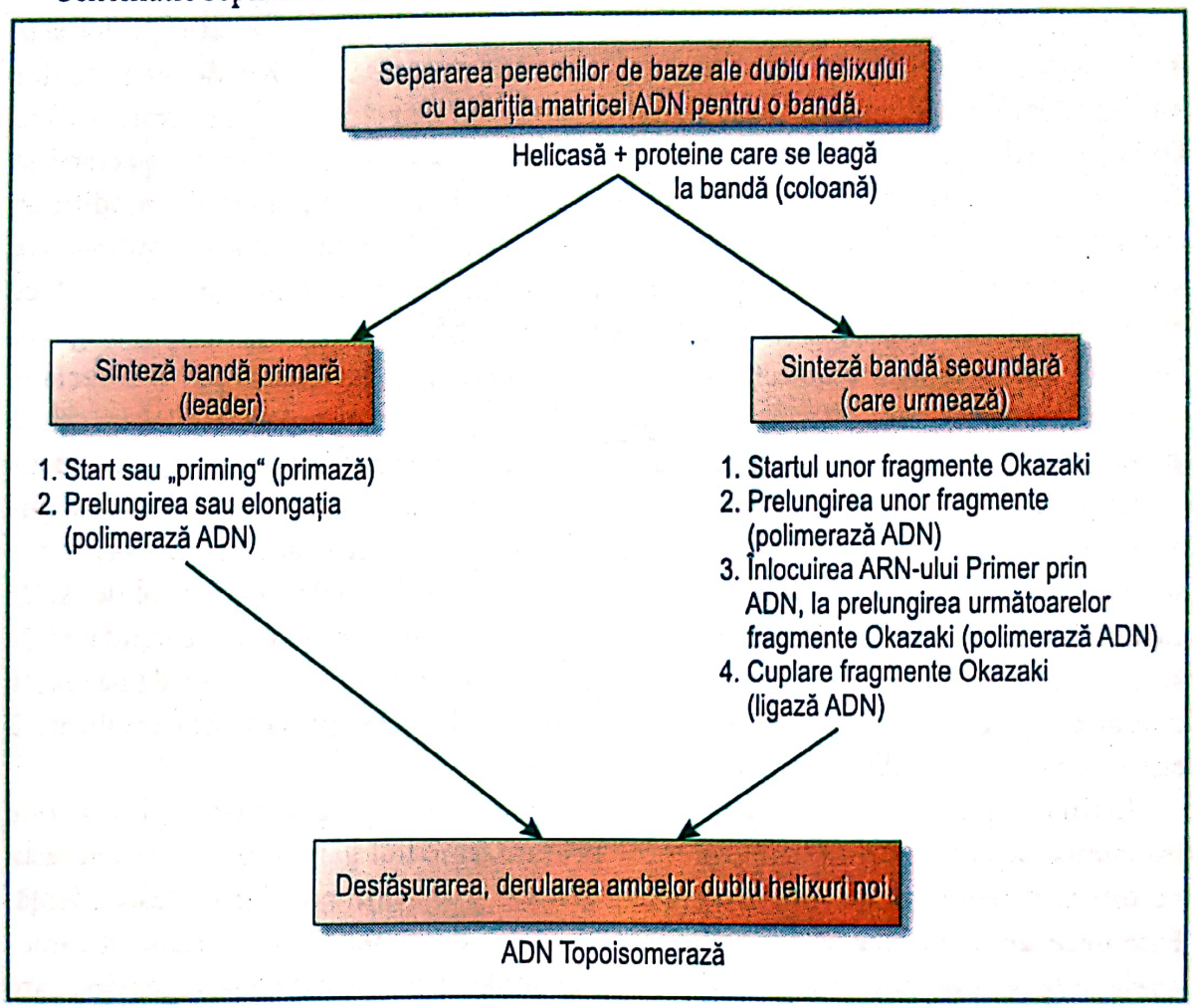


Fig. 49 – O schemă concentrată a replicării ADN-ului.
(1) Helicasa separă perechile de baze ale dublu helixului mamă.
(2) Proteinele cuplate la fiecare bandă împiedică formarea unor noi perechi de baze
(3) Banda lider este sintetizată de către polimeraza ADN în mod continuu pe direcția 5' - 3'.
(4) Banda care urmează să se formeze este sintetizată discontinuu. Primasa formează un ARN primer, scurt, care cu ajutorul polimerazei ADN și a apariției unor fragmente Okazaki asigură alungirea pe direcția 5' - 3'.
(5) După înlocuirea ARN-ului primer prin ADN (de către o altă polimerază ADN) ligasa ADN adună fragmente Okazaki într-o nouă bandă ADN (*prelucrare după Campbell A. Neil, 2000 și Albert B. și colab., 2004*)

Scanned with OKEN Scanner

Această enigmă a fost descifrată odată cu descoperirea **topoisomerazei-ADN** (de la grecesul *topos* pentru loc). Această enzimă poate să smulgă ADN-ul fără a fi necesară rotația dublu helixului, ci numai crearea unor breșe (puncte de rotație) în coloana de ADN. Locurile de demarare a rotațiilor s-au multiplicat în acest fel, iar după derularea dublu helixului și replicarea ADN-ului aceste breșe au fost apoi reparate. Această muncă se desfășoară în paralel cu cea de replicare și conduce, așa cum am văzut, la apariția a două dublu helixuri complete.

Schematic replicarea arată astfel:



2.1.7. Corecția și repararea daunelor în ADN-ul replicat

Urmare a procesului de replicare, oricât de perfect ar lucra natura, nu sunt excluse greșeli în formarea prin sinteză a noilor molecule de ADN. În general, cercetările au arătat că greșelile întâlnite în noile molecule ADN sunt de numai 1 : 1 miliard. Greșelile apar cel mai adesea la alegerea perechilor de baze și în faza inițială rata de a greși coboară la 1: 10.000. Numai că aceeași natură grijulie, prin mecanisme extrem de elaborate, pe care în laborator nici un savant nu le-ar putea crea, a pus la punct mecanisme de corecție pentru repararea acestor greșeli inițiale. Spre exemplu, de îndată ce mecanismul de corecție constată că o bază azotată este incorect aleasă, atunci ea este scoasă și înlocuită, la fel ca o piesă uzată într-un utilaj mecanic, cu aceea bună, exactă.

Scanned with OKEN Scanner

La bacterii, enzimele denumite polimeraze ale ADN-ului preiau funcţia de detecţie şi corecţie. Pentru aceasta, enzima induce înainte de sinteza fiecărui nucleotid un detector-corector la capătul fiecărei benzi-matrice. Dacă mecanismul de recunoaştere depistează o pereche falsă în nucleotid, polimeraza revine şi înlocuieşte ce s-a greşit, adică baza falsă şi numai după aceea continuă replicarea. Cum s-ar spune mai modern, avem de-a face cu un control şi o intervenţie direct pe fluxul replicării şi nu după ce aceasta a avut loc*. În cazul eucariotelor, pentru repararea unei asemenea greşeli, polimeraza ADN-ului are nevoie de ajutorul mai multor proteine.

În anul 1994, cercetătorii au descoperit un defect important al acestor proteine la pacienţi cu o anumită formă de cancer al intestinului gros. Dacă decodorul greşelilor nu depistează aceste greşeli şi ele nu sunt corectate, există pericolul acumulării lor. Din aceste motive, alături de mecanismul de detecţie şi corecţie existent la bacterii, la eucariote s-au descoperit şi alte mecanisme, cu menirea de a repara şi alte modificări întâmplătoare şi nedorite în ADN. Diferite chimicale, lumina, radiaţiile radioactive sau ultraviolete ar putea influenţa informaţia codată genetic de o manieră care ar face să se producă cantităţi mari de material genetic fals, neconform cu genotipul originar. Din fericire, toate aceste defecţiuni care ar putea conduce la mutaţii pot fi corectate, atâta vreme cât nu sunt distruse şi mecanismele de corecţie, de reparare. Fiecare celulă îşi reexaminează şi îşi repară în permanenţă materialul genetic. Biochimiştii au identificat până în prezent peste 50 de mecanisme de reparare a ADN-ului, toate cu ajutorul enzimelor. Cele mai numeroase mecanisme de reparare examinează exactitatea structurilor perechilor baze. În cazul unor reparaţii excizionale, segmentul de ADN care deţine locul incriminat este extras de către enzime reparatoare de pe banda ADN iar golul provenit prin această extracţie şi care corespunde unei secvenţe de baze este completat (umplut) cu nucleotide intacte, corecte. În acest proces sunt implicate 2 enzime: polimeraza ADN şi lipasa ADN (fig. 50).

În final, replicarea ADN-ului conduce la crearea unei copii genetice, copie care este transmisă de către părinţi, urmaşilor lor prin intermediul gameţilor. Pentru aceasta nu este suficientă numai simpla copiere a genelor şi transmiterea lor în descendenţă. **Este necesar ca acestea să se şi exprime.** Pentru a descoperi cum se transmit caracterele, este necesar să cunoaştem şi principiile moleculare ale exprimării genelor, care vor fi tratate în paginile următoare. ■

2.2 DIFERENŢA ÎNTRE ÎNMULŢIREA ASEXUATĂ ŞI SEXUATĂ

În biologie nu întotdeauna egalul = egal. Faptul este valabil numai pentru înmulţirea asexuată. Prin reproducţie se înţelege de fapt „fabricarea unui urmaş". Să nu uităm că reproducţia nu este egală şi nu se suprapune în biologie **noţiunii de înmulţire.** Despre acest lucru am mai discutat. Este însă bine să insistăm. Doi părinţi care au un copil **s-au reprodus** dar **nu s-au înmulţit.** Reproducerea asexuată, în lipsa organelor sexuale sau **reproducerea vegetativă** este de fapt o înmulţire, pentru că noul

* Acest model din natură a fost extins recent în economie, mai exact în controlul siguranţei alimentare. Termenul consacrat este traseibilitate (traseybility în engleză sau rukeferfolgbaikeit în germană)

Scanned with OKEN Scanner

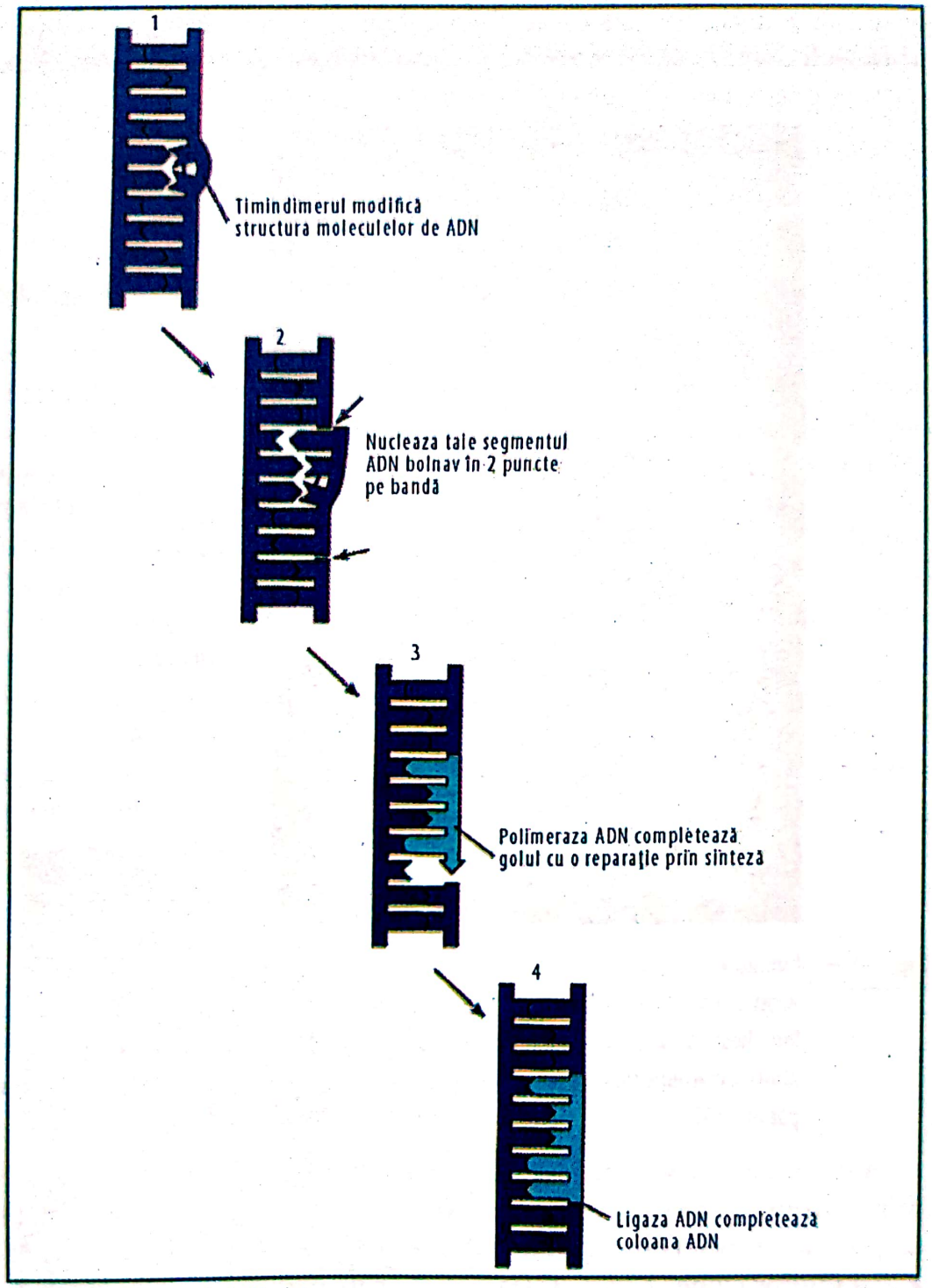


Fig. 50 – Reparaţii excisionale ale ADN-ului.

Aşa cum se observă, o grupă de enzime caută, găseşte şi repară ADN-ul defect. Tipul de ADN defect constă într-o cuplare covalentă a bazelor Timină învecinate

Timindimerul, acea „umflătură" apare ca urmare a expunerii la ultraviolete şi conduce la o deformare a ADN-ului şi, în final, la erori în replicarea acestuia. Enzimele reparatorii pot înlătura segmentul de ADN defect, înlocuindu-l cu un segment intact. Una dintre enzime este endonucleaza care operează repararea coloanei ADN pe dinăuntru, spre deosebire de exonucleaza care execută tăierea cauzată de greşeli de la final şi evită blocarea replicării (*după Campbell A.N., 2000 şi Culotta E. şi colab., 1994*)

Scanned with OKEN Scanner

organism, individ, care apare este rezultatul unui **singur părinte**, iar acesta transmite urmaşilor copii după toate genele sale. Un exemplu de înmulţire asexuată devenit clasic este cel al polipului de apă dulce, *Hydra* (fig. 51).

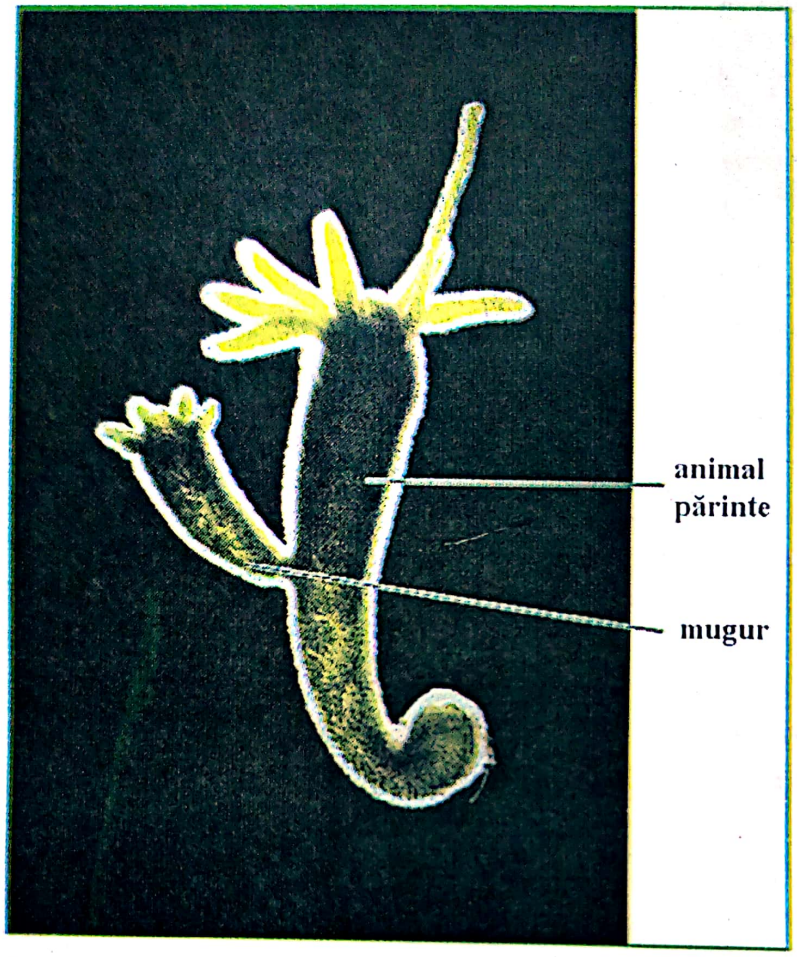


Fig. 51 – Înmulţirea vegetativă la *Hydra*.
Acest animal pluricelular este extrem de simplu construit. Este un polip de apă dulce care se înmulţeşte asexuat (în afara organelor sexuale, model vegetativ) prin înmugurire. Mugurii apar printr-o diviziune celulară mitotică şi se dezvoltă ca o micuţă *Hydra*, care apoi se separă de animalul părinte (LM).

Aici înmulţirea se face prin **înmugurire**. Mugurele apare din organismul tată prin diviziune mitotică (vezi şi fig. 27) şi din această cauză el este genetic identic cu acesta. Un organism care se înmulţeşte asexuat este de fapt fabricantul unei **clone** sau a **mai multor clone**. Aceasta înseamnă că apare o grupă de indivizi genetic identici. Fenomenul **clonării** se practică astăzi şi la organisme ce se înmulţesc sexuat şi va reprezenta un subiect aparte al acestei lucrări.

Spre deosebire de înmulţirea asexuată, cea sexuată, bazată pe organe şi celule sexuate, conduce şi este supusă unei mari variabilităţi. Prin unirea sexuată a părinţilor, descendenţii vor primi o combinaţie de gene care vor proveni de la amândoi părinţii. Spre deosebire de o clonă, rezultatul reproducerii sexuate va fi un urmaş care va grupa unele însuşiri comune ale părinţilor dar care, în acelaşi timp, se va diferenţia semnificativ de fiecare dintre ei. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.3. PROBLEME ALE ÎNMULȚIRII SEXUATE – CICLUL DE DEZVOLTARE SEXUATĂ

În cazul înmulțirii sexuate, prin ciclul de dezvoltare se înțelege dezvoltarea și înmulțirea unui organism începând cu fecundarea celulelor sexuate până la producerea unui urmaș. Pe acest segment ne propunem să urmărim comportamentul cromozomilor în perioada ciclului de evoluție sexuată. ■

2.3.1. Ciclul de dezvoltare la oameni

Fiecare celulă somatică umană (adică toate celulele, mai puțin spermatozoizii și ovulele ca și etapele anterioare lor) conțin 46 cromozomi. În lumina microscopului, urmărind cu atenție, se poate diferenția un cromozom de altul, deoarece grosimea, lungimea ca și centromerii sunt diferiți. După tratarea cu anumiți coloranți, cromozomul se prezintă ca o bandă specifică asemănătoare unei benzi spectofotometrice. Cercetarea atentă a unei fotografii microscopice arată că cei 46 cromozomi sunt dispuși sub formă de perechi. O asemenea prezentare a cromozomilor este denumită cariotip (fig. 52). Cariotipul reprezintă deci o prezentare ordonată a cromozomilor unui individ. Oamenii de știință au pus la punct metode extrem de sigure pentru elaborarea cariotipului, care pot fi găsite în literatură (Campbell A. Neil, 2000).

În procesul de identificare a cariotipului, pot fi ușor scoși în evidență cromozomii atipici aberanți, datorită unor gene aberante, care pot provoca boli genetice, ereditare dintre cele mai grave.

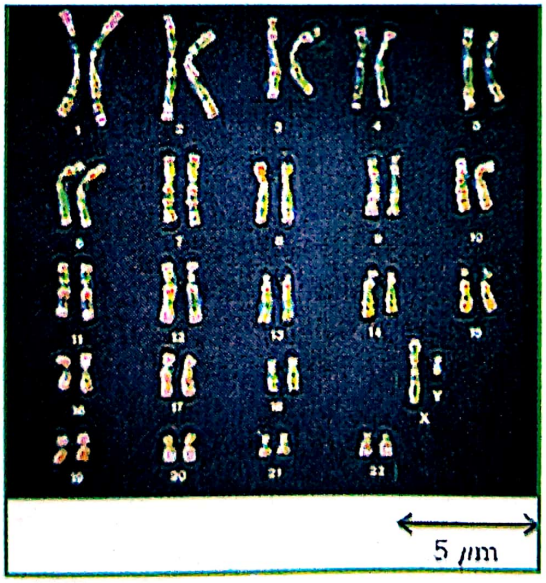


Fig. 52 – Prezentarea obișnuită a cromozomilor sub formă de cariotip.
Cromozomii care formează o pereche, adică aceia care au aceeași lungime, aceeași poziție a centromerului și aceeași bandă coloră se numesc **cromozomi omologi**. Amândoi cromozomii perechi poartă gene care induc, definesc aceleași însușiri ereditare. De exemplu: gena care indică culoarea ochilor individului ocupă aceeași poziție pe ambii cromozomi (*Campbell A.N., 2000*)

Există însă și o excepție de la regula cromozomilor omologi. Există cromozomi sexuali care sunt notați cu „x" și „y". Femeile ocupă 2 cromozomi „x" (xx). Bărbații au

Scanned with OKEN Scanner

un cromozom „x" şi un cromozom „y" (xy). Deoarece acest cromozom este cel care diferenţiază sexul, x şi y se mai numesc „cromozomi sexuali". Restul cromozomilor, cei obişnuiţi se numesc **autosomi**.

Apariţia cromozomilor sub formă de perechi în cariotipul uman este urmarea înmulţirii sexuate. Noi moştenim de la fiecare părinte-parte numai unul din cei 2 cromozomi pereche. Cei 46 cromozomi din celulele noastre somatice apar ca o dublare a celor 23 cromozomi aparţinând fiecărei părţi sexuale (mamă şi tată). Aşa cum am mai spus, fiecare celulă sexuată denumită şi **gamet** deţine un set de **22 autosomi** plus un singur cromozom sexual care poate fi x sau y. O celulă cu un singur set de cromozomi este denumită **haploidă**. La om numărul de cromozomi ai unei **haploide** este notat cu „n" şi reprezintă 23 cromozomi, deci **n=23**.

După împerechere, deci după unirea sexuată a celor 2 parteneri rezultă că un spermatozoid haploid de la tată fuzionează cu un ovul haploid de la mamă, iar fenomenul se numeşte **fecundare** (**singamie** sau **fertilizare**).

Ceea ce rezultă din fecundarea celulelor haploide se numeşte **zigot** şi el conţine două seturi de cromozomi în care genele mamă şi tată sunt combinate după un anumit program. Zigotul şi celulele care se dezvoltă din el deţin câte 2 seturi de cromozomi şi se numesc diploide. La oameni deci numărul de cromozomi diploizi este de 46, adică 2n=46.

În procesul de dezvoltare a omului din zigot până la adult, genele acestuia prin mitoză vor transmite cu mare exactitate acest număr de cromozomi către toate celulele somatice ale organismului. Din această cauză, celulele somatice, ca dotare genetică, sunt asemănătoare zigotului din care, de fapt, provin, adică sunt diploide.

Singurele celule ale corpului uman care nu provin din mitoză sunt gameţii care se dezvoltă în **gonade** (ovar la femei şi testicule la bărbaţi). Se poate imagina ce s-ar întâmpla dacă gameţii ar fi apărut din evoluţia unei mitoze. Ar fi fost ca şi celulele somatice diploizi. În faza următoare însă, după fecundare numărul cromozomilor prin contopire s-ar fi dublat de la 46 la 92 şi la fiecare nouă generaţie s-ar fi întâmplat acelaşi lucru. Or, acest lucru ar fi blocat stabilitatea materiei vii.

Acest fenomen prin care organismele care se înmulţesc sexuat îşi înjumătăţesc în gameţi numărul de cromozomi pentru ca apoi să şi-l dubleze din nou după fecundare în procesul de diviziune celulară se numeşte **meioză**. El se derulează în ovare şi testicule. Prin fecundare este reconstruit statutul de diploide al celulelor umane şi ciclul dezvoltării umane începe cu o nouă generaţie (fig. 53).

2.3.2. Diversitatea în dezvoltarea ciclurilor sexuate

Cu toate că schimbul între meioză şi fecundare are loc la toate organismele care se înmulţesc sexuat, durata desfăşurării acestui fenomen este diferită de la o specie la alta. Cercetătorii au descoperit 3 asemenea cicluri diferenţiate care sunt prezentate în figura 54.

a) Ciclul uman se regăseşte în unul din aceste tipuri care reprezintă toate animalele, dar şi unele plante inferioare şi chiar unele protozoare. Gameţii sunt singurele celule haploide. Meioza se desfăşoară în perioada formării gameţilor,

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

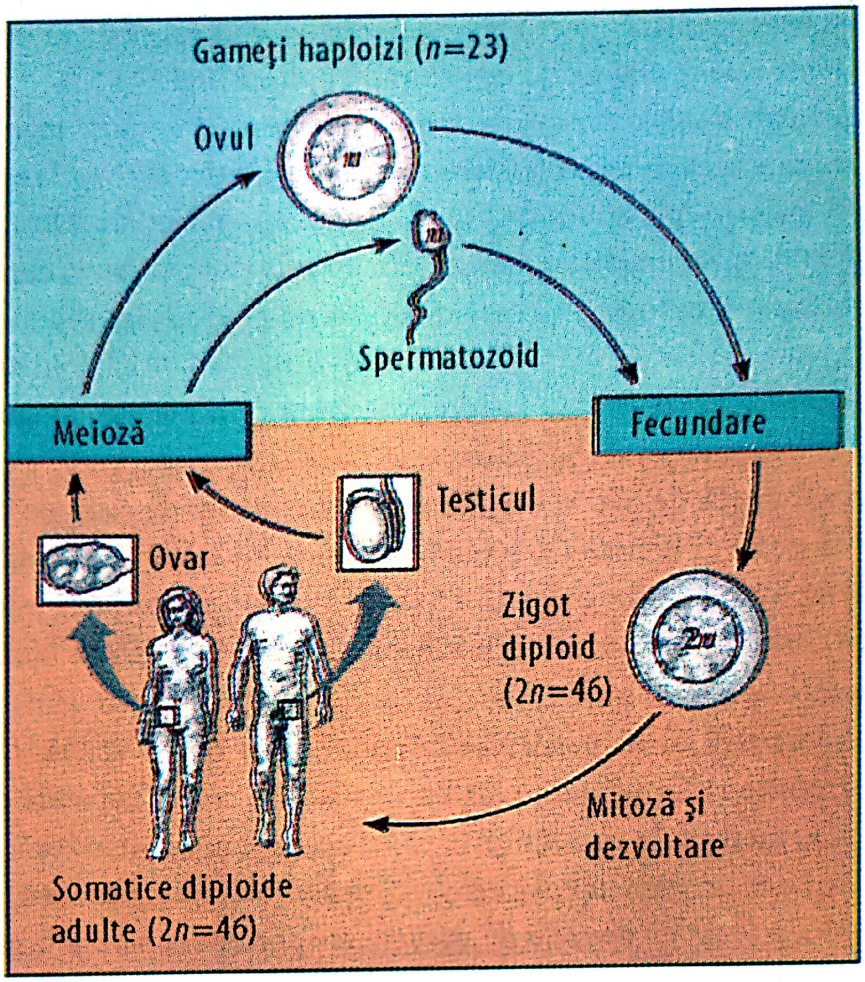


Fig. 53 – Ciclul de dezvoltare la om.
În fiecare eneraţie în perioada fecundaţiei se dublează numărul de cromozomi iar prin procedeul meioză este din nou înjumătăţit. La oameni numărul de cromozomi al celulelor haploide este de 23 (n=23). Numărul de cromozomi din zigot şi în continuare în toate celulele somatice rezultate este de 46 (2n=46). Culoarea albastru-verzui a desenului reprezintă fazele haploide, iar cea brun-gălbuie (jos) stadiile diploide. În figurile următoare această coloristică va fi menţinută (*Campbell A.N. şi colab., 2003 – prelucrare*)

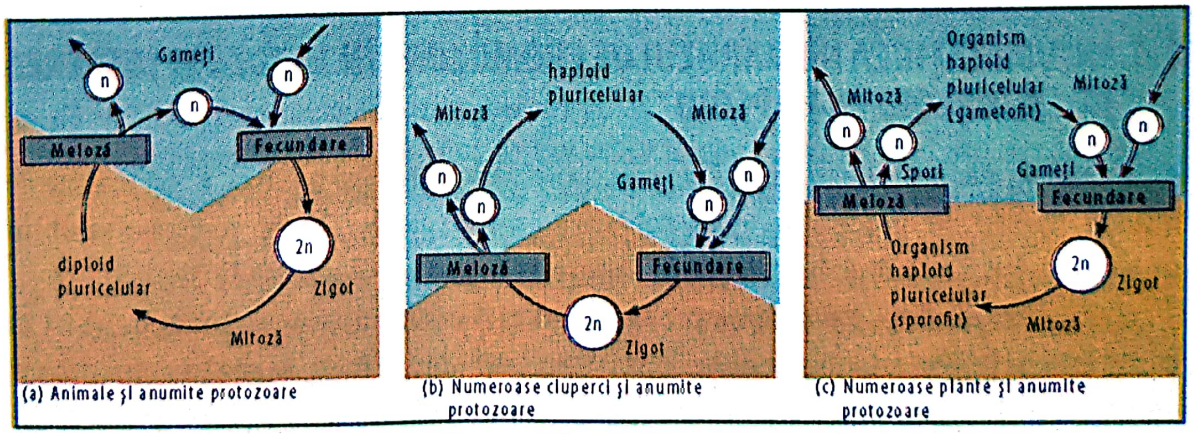


Fig. 54 – Trei cicluri de dezvoltare sexuată care se diferenţiază în momentul acestor evenimente cheie care influenţează variabilitatea genetică a urmaşilor (*prelucrare după Anderson A., 1992 şi Campbell A.N., 2000*)

care înaintea fecundării nu se mai divid. Zigoții diploizi se divid mitotic și se dezvoltă într-un organism diploid denumit **diplont** (fig. 54 a).

b) Al doilea tip de ciclu de dezvoltare se întâlnește la numeroase ciuperci și plante inferioare ca și la anumite protozoare, animale primitive etc. (ex. la agentul care provoacă malaria - **plasmodium**). După fuzionarea gameților și formarea unui bigot diploid, apare imediat o **meioză**. Aceasta conduce la celule haploide, care însă se înmulțesc mitotic și creează un organism pluricelular, sau numai celule haploide care trăiesc ca atare (protozoare). Organismul haploid se numește **haplont**. El formează gameți prin mitoză și nu prin meioză. Singurul stadiu diploid este doar **zigotul** (fig. 54 b).

c) Numeroase specii de plante derulează și al treilea tip de ciclu de dezvoltare, care și el poate fi considerat schimb de generații (este vorba mai exact de schimb diplohaploid de generații). Stadiul diploid pluricelular este denumit **sporofit**. Prin meioză rezultă celule haploide sporofite, care se numesc **spori**. Spre deosebire de un gamet, un spor se dezvoltă într-un organism (individ pluricelular) fără ca în prealabil să fuzioneze cu o altă celulă. Un spor se divide **mitotic** și formează un stadiu format din celule haploide care a fost denumit **gametofit**. În gametofiții haploizi apar gameți prin mitoză. Rezultatul fecundării este un zigot diploid, care apoi se dezvoltă spre sporofiții următoarei generații. La acest fel de ciclu de dezvoltare sporofitul apare din gametofit și invers, gametofitul din sporofit. Aceste tipuri de organisme se numesc **diplo-haplont** (fig. 54 c).

O analiză atentă arată că cele 3 tipuri de cicluri de dezvoltare se deosebesc în „momentele" meioză și fecundare. Există totuși câteva lucruri și fenomene comune, și anume cele legate de faptul că „fiecare ciclu de înjumătățire și dublare a numărului de cromozomi conduc la variabilitatea genetică a descendenților". Cauzele variabilității pot fi bine înțelese dacă se analizează atent faza meiozei. ■

2.4. ÎNJUMĂTĂȚIREA NUMĂRULUI DE CROMOZOMI ÎN MEIOZĂ ȘI TRECEREA DE LA DIPLOID LA HAPLOID

Există multe asemănări, mulți pași comuni între mitoză și meioză. Ca și înainte de mitoză, înainte de meioză are loc o dublare a cromozomilor. După replicare se obțin una după alta două diviziuni celulare denumite meioză I și meioză II (fig. 55).

Prin acest model de diviziune rezultă în total 4 celule fiice (nu numai două ca în cazul mitozei): Fiecare nouă celulă deține însă numai jumătate de cromozomi din cei ai celulei de la care s-a plecat.

Figura 56 explică în detaliu cele două diviziuni meiotice în cazul unei celule de proveniență animală, celulă cu un număr de cromozomi diploizi = 4 (2n=4).

Scanned with OKEN Scanner

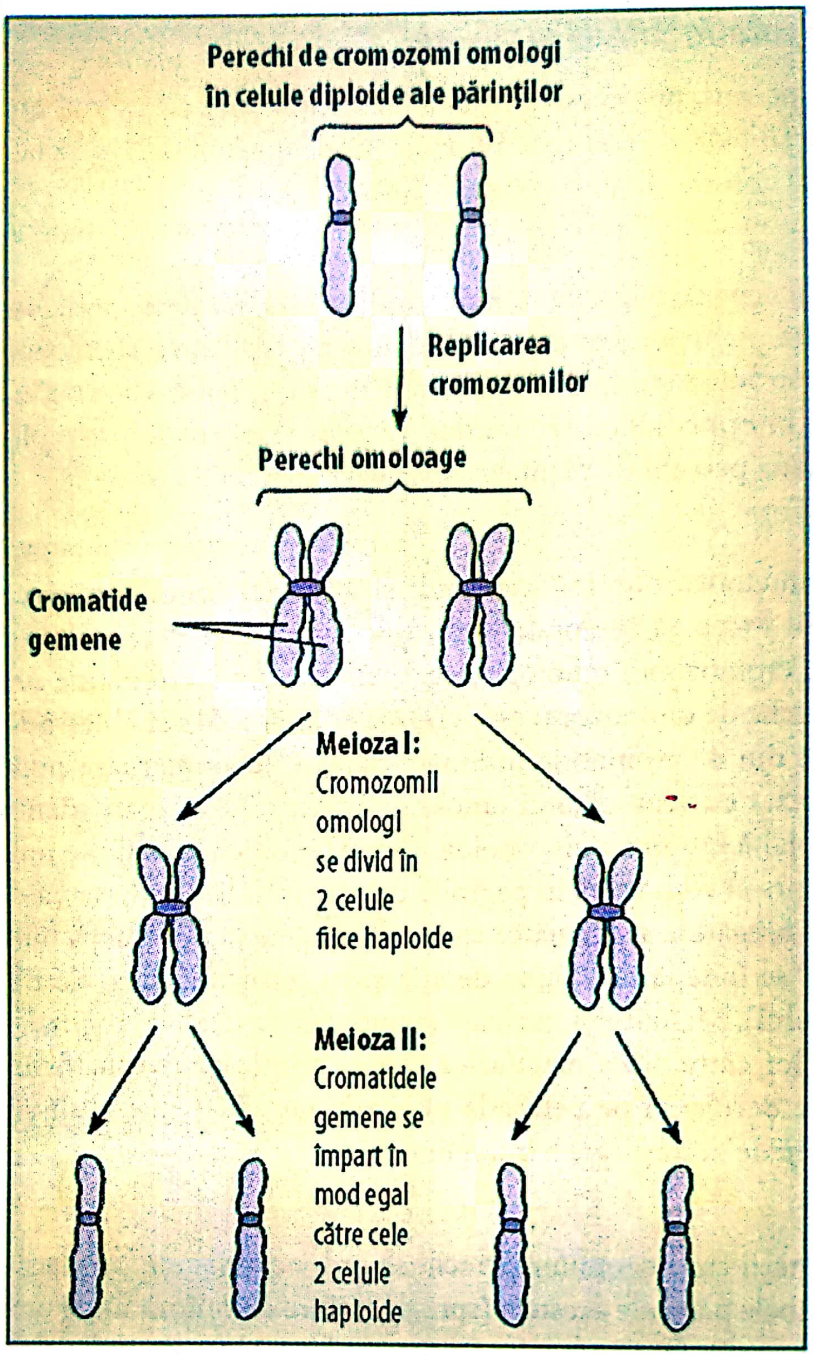


Fig. 55 – Reducerea numărului de cromozomi în meioză.
Cromozomii se divid o singură dată, de două ori însă la celule diploide părinteşti, din care rezultă 4 celule fiice haploide. La prima diviziune (meioza I), cei doi cromozomi se distribuie fiecărei perechi din ambele celule fiice. În cea de-a doua diviziune (meioza II) se distribuie cromatidele surori identice fiecărui cromozom (vezi şi fig. 56). Amândoi cromozimii omologi ai unei perechi sunt individuali, provenind din cromozomul de bază al unor părinți. Cromozomii omologi se văd egali în lumina microscopului. Ei poartă însă pe anumite segmente ale genelor diferite variații ale acestora care se colorează diferit. Constituția cromozomilor va fi diferită între o ființă umană purtătoare de pistrui şi o alta fără pistrui. Înainte de a intra în meioză, fiecare cromozom se replică şi formează cromatide surori identice, care până în faza de meioză II rămân legate (*Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

2.4.1. Comparația mitozei cu meioza

Pentru început, prezentarea în detaliu a evoluției celor două meioze este redată în figura 56 (*Biologia* – Campbell A.N., 2000, Campbell A.N. și colab., 2004; *Biologia moleculară a celulei* – Lodish și colab., 2001).

Interfaza I

Meioza începe cu o interfază în perioada căreia fiecare material își dublează materialul genetic. Acest proces este asemănător cu replicarea cromozomilor în mitoză. Din fiecare cromozom apar 2 cromatide surori, genetic identice, care se leagă una de alta prin intermediul centromerilor. Perechea de centrioli se replică la rândul ei și formează două perechi (la plantele superioare centriolii lipsesc).

Profaza I

Profaza meiotică durează mai mult și este mai complicată decât faza mitotică. Cromozomii încep să se condenseze. Într-o secvență denumită sinapsă (sinapsis), se întâlnesc cromozomii omologi, fiecare născut din 2 cromatide surori sau perechi. Fiecare pereche de cromozomi este vizibilă la microscop ca o **tetradă**, adică un complex format din 4 cromatide ordonate paralel. În numeroase puncte, cromatidele s-au intersectat cu cromozomii omologi. Această intersectare, denumită chiasmată, menține laolaltă cromozomii omologi (acest fenomen genetic se numește „crossing-over" și despre el vom vorbi în paginile următoare). În continuarea derulării profazei I celulele se pregătesc asemănător ca la mitoză pentru diviziunea nucleului. Perechile de centrioli se îndepărtează una de alta și își formează între ele fibrele de legătură (fibrele fusului). Membrana nucleară și nucleolii se dizolvă. În final, începe mișcarea cromozomilor către placa metafazică care se formează la ecuator între cei doi poli. Profaza I se derulează pe perioada unei zile sau chiar mai mult și ocupă 90% din întregul timp de desfășurare a întregii meioze.

Metafaza I

Centromerii cromozomilor perechi se ordonează acum pe placa metafazică, mai exact de ambele părți ale acesteia (spre deosebire de mitoză unde ordonarea s-a făcut la un singur nivel). Fibrele fusului fiecărui pol intră în contact cu centromerii cromozomali cei mai apropiați și, în felul acesta cromozomii omologi se leagă la distanță egală vizavi de poli.

Anafaza I

Ca și în cazul mitozei, aparatul ce alcătuiește fusul deplasează cromozomii spre polii celulei. Cromatidele surori rămân însă în continuare legate la centromerii lor și se deplasează ca un „întreg" spre același pol. Cromozomii omologi se deplasează spre polii opuși. Aceasta este o diferență esențială privind comportamentul cromozomal față de mitoză. În mitoză se ordonează cromozomii individual și nu sub formă de perechi pe placa metafazică, iar aparatul „fus" separă cromatidele surori ale fiecărui cromozom.

Scanned with OKEN Scanner

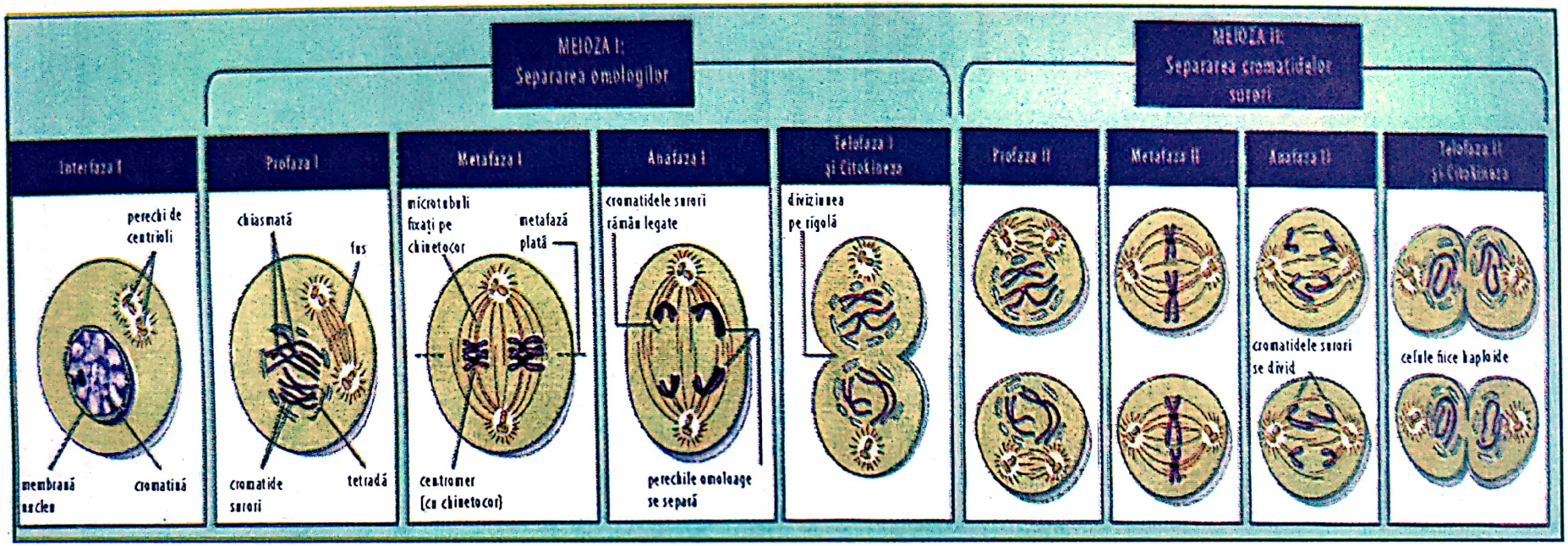


Fig. 56 – Stadiile diviziunii meiotice

Telofaza 1 şi citokineza

Aparatul fus continuă separarea omologilor perechi până ce aceştia ajung în final în polii celulei. La fiecare pol se adună de această dată un set haploid însă fiecare cromozom, care acum nu mai poate fi recunoscut, este încă alcătuit din cele două cromatide. În mod obişnuit, citokineza (diviziunea citoplasmei) se obține simultan cu telofaza I, în care sunt formate 2 celule surori. La unele celule animaliere prin înfăşurarea membranei plasmatice se formează o rigolă de separare în timp ce la unele celule ale plantelor aceasta apare din interior către exteriorul plăcii celulare. La anumite specii tot în telofază se formează membrana nucleară şi nucleolii. La alte organisme celulele fiice apărute în telofaza I încep imediat pregătirea celei de-a 2-a diviziuni meiotice. În nici un caz între cele 2 diviziuni meiotice nu are loc nici o replicare a materialului genetic.

Profaza II

Cromozomii redevin vizibili individual. Se formează un nou aparat fus şi cromozomii se deplasează spre zona ecuatorială.

Scanned with OKEN Scanner

Metafaza II

Cromozomii se ordonează pe placa metafazică în mod asemănător mitozei, adică cu centromerii lor tot la nivel ecuatorial, dar în care chinetocorii cromatidelor surori ale fiecărui cromozom se află la polii opuşi.

Anafaza II

Cromatidele surori se separă la centromer şi se deplasează spre polii celulelor. Acum ele devin cromozomi individuali.

Telofaza II şi citokineza

La polii celulelor începe formarea nucleului şi se desfăşoară citochineza. Apar acum vizibile 4 celule fiice care poartă fiecare câte un set de celule haploide. ■

2.4.2. Comparaţii meioză - mitoză

a) În timpul profazei I a meiozei, perechile se replică, adică din două cromatide surori identice apar cromozomii cu omologii lor. Cele 4 cromatide care se află una lângă alta sunt recunoscute în lumina microscopului ca **tetrade**. Totodată se recunosc la microscop structurile de formă „X", denumite **chiasme** (chiasmă singular). Ele rezultă din intersectarea cromatidelor nesurori, adică a cromatidelor care aparţin unor cromozomi diferiţi, dar omologi. Chiasmele constituie urmarea vizibilă a unor schimburi genetice de încrucişare denumite crossing-over. În mitoză nu vom observa nici tetradele şi nici chiasmele.

b) În metafaza I a meiozei, perechile de cromozomi omologi se ordonează pe placa metafazică.

c) În anafaza I a meiozei, centromerii nu se divid şi de aceea nu se separă nici cromatidele surori cum de fapt se întâmplă la mitoză. Dimpotrivă, s-a putut constata că 2 cromatide surori ale cromozomului rămân legate una de alta şi se deplasează spre acelaşi pol al celulei.

În meioza I, cromozomii omologi sunt separaţi. În mitoză, dimpotrivă, cromatidele surori sunt separate.

Cea de-a doua diviziune meiotică, meioza II se ocupă cu separarea cromatidelor surori, iar mecanismul ei corespunde aproape în întregime mitozei. Deoarece, cromozomii între meioza I şi II nu se replică (nu se dublează), rezultă prin meioză o înjumătăţire a cromozomilor celulei (vezi şi fig. 57). ■

2.5. DEZVOLTAREA CICLULUI SEXUAT ŞI VARIABIITATEA GENETICĂ A DESCENDENŢILOR

Înmulţirea sexuată a indivizilor presupune, aşa cum am văzut, un anume comportament al cromozomilor în meioză şi fecundarea în fiecare generaţie. Aceste elemente sunt responsabile în cea mai mare parte de variabilitatea populaţiilor urmaşe. Pentru explicarea acestor fenomene vor fi studiate în continuare mecanismele care influenţează această variabilitate, şi anume: recombinarea liberă a cromozomilor, recombinarea prin crossing-over şi fecundarea întâmplătoare. ■

Scanned with OKEN Scanner

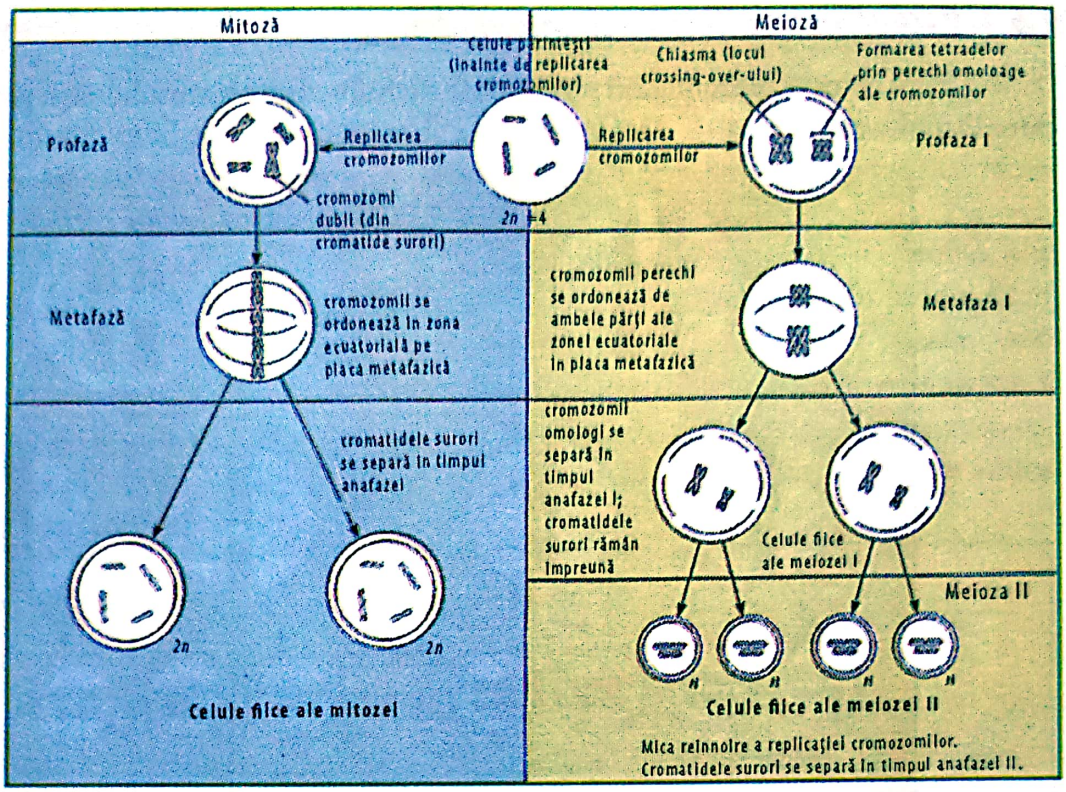


Fig. 57 – Comparaţie între meioză şi mitoză la animale (*Campbell A.N., 2000 şi 2003*)

Tabelul 58

Recapitulare a comparaţiei mitoză - meioză

Eveniment	Mitoză	Meioză
Replicarea ADN	Se desfăşoară pe perioada interfazei, înaintea începerii diviziării nucleului.	Se desfăşoară în perioada interfazei, înaintea începerii diviziării nucleului.
Numărul de diviziuni celulare	Una, rezultând din profază, metafază, anafază şi telofază	Două, fiecare rezultând din profază, metafază, anafază şi telofază; între cele două diviziuni ale nucleului (meioza I şi II) nu are loc nici o replicare ADN. Ca o caracteristică a meiozei, în timpul meiozei I, cromozomii se împerechează, cu care ocazie se formează tetradele, adică grupe de 4 cromatide.
Numărul de celule fiice şi de cromozomi	Două, fiecare este diploidă (2n) şi genetic identică cu celula mamă.	Patru, la care însă fiecare are jumătate din cromozomii celulei mamă (haploid, n). Ele nu sunt identice genetic, nici cu celula mamă şi nici între ele.
Importantă pentru animal	Dezvoltarea unui organism pluricelular dintr-un zigot. Producţia de celule pentru creştere şi însănătoşirea celulelor.	Producerea gameţilor, reducerea la jumătate a numărului de cromozomi care dispun variabilitatea genetică a gameţilor.

Scanned with OKEN Scanner

2.5.1. Recombinarea liberă a cromozomilor

În figura 59 este prezentată o posibilitate de influenţare a variabilităţii genetice de către înmulţirea sexuată.

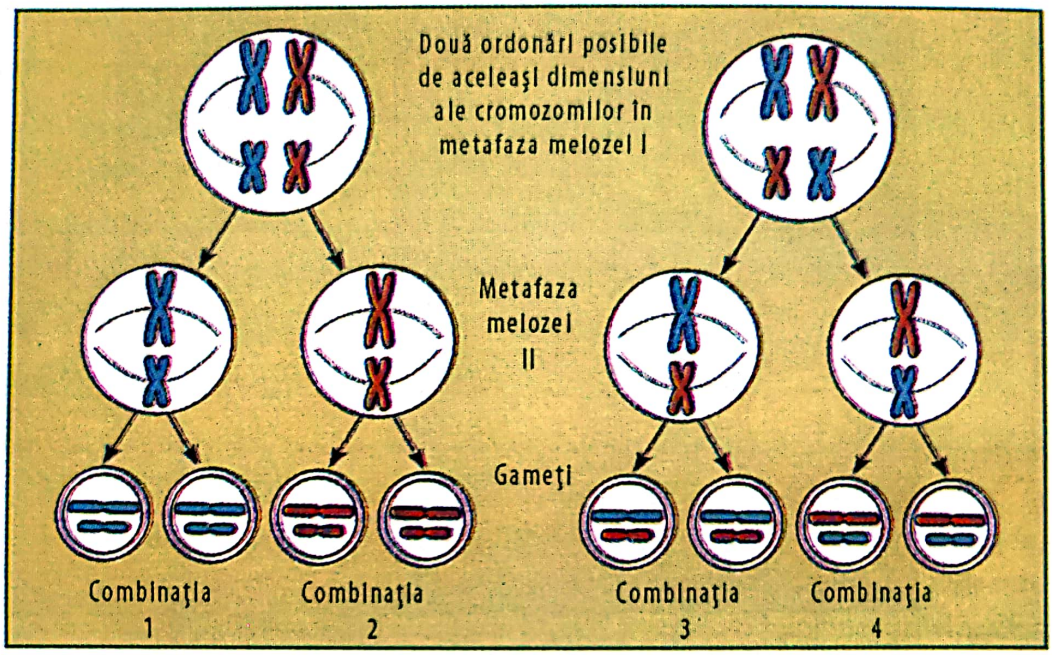


Fig. 59 – Ordonarea alternativă a celor 2 perechi de cromozomi omologi pe placa metafazică a meiozei I. Această schemă explică ceea ce rezultă din meioza unui organism ipotetic cu un set de 4 cromozomi diploizi (2n=4). Originea parentală a cromozomilor este redată printr-un cod color, şi anume cromozomii unui părinte sunt coloraţi în albastru, iar ai celuilalt în roşu. Care anume din cei 2 cromozomi omologi se va deplasa spre unul sau altul din poli este o problemă de teoria probabilităţii (întâmplare, cap sau pajură la monedă). Această orientare determină totuşi care din cei 2 cromozomi omologi ajung într-o anumită celulă fiică. Aşa cum se va vedea, acest fenomen a fost studiat începând cu Mendel, care însă nu ştia nimic despre cromozomi (*prelucrare după Campbell A.N., 2000 şi 2003*)

Se recunoaşte deja că în metafaza meiozei I cromozomii omologi se situează grupaţi în perechi pe placa metafazică. Orientarea, respectiv deplasarea lor spre cei 2 poli ai celulei este întâmplătoare. Pentru fiecare pereche există 2 posibilităţi. Din această cauză există o şansă de 50:50 pentru fiecare celulă fiică să primească perechi de cromozomi tată sau mamă. Pe de altă parte, deoarece în metafaza I fiecare pereche de cromozomi omologi se poate orienta independent de celelalte perechi, fiecare gamet poate reprezenta una din toate posibilităţile de recombinare a cromozomilor mamă sau tată.

În exemplul prezentat al combinaţiilor posibile pentru 2n=4 (n=2), este cifra 4. În cazul că n=3 ar fi existat pentru gameţi 8 posibilităţi de combinaţii cromozomale. În general, numărul total al combinaţiilor posibile este de 2^n, în care, firește, n=numărul de cromozomi haploizi. La om setul de cromozomi haploizi n=23. Rezultă că numărul posibil al recombinaţiilor mamă x tată este de 2^{23}, adică de circa 8 milioane. Fiecare gamet produs prin fecundarea celulelor sexuale umane conţine una din cele 8 milioane de recombinaţii posibile a cromozomilor mamă şi tată. Aşadar o variabilitate extrem de mare. Putem spune deci că fiecare din noi suntem „unici", cel puţin atâta vreme cât populaţia planetei nu a ajuns la 6400 miliarde de locuitori. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.5.2. Recombinarea prin crossing-over

Conform celor arătate până în prezent ar trebui ca fiecare cormozom al unui gamet să conţină un material genetic exclusiv de la mamă şi tată. Asta ar însemna că fiecare cormozom individual nu ar trebui să conţină material genetic amestecat. Şi cu toate acestea, nu se întâmplă aşa.

Procedeul crossing-over permite producerea unor cromozomi care provin din gene preluate de la ambii părinţi. Acest **crossing-over** se realizează în timpul profazei meiozei I. S-a arătat deja că în profaza I, cromozomii omologi se împerechează (vezi fig. 60). Prin aceasta ei se apropie în regiunea centrală pe lungimea axei lor până la 0,1 µm şi cu ajutorul unei proteine care conţine ARN formează un complex sinaptonemal (complex pereche). Proteinele nucleare acţionează aici ca un fermoar, care aduce cromozomii strâns unul de altul.

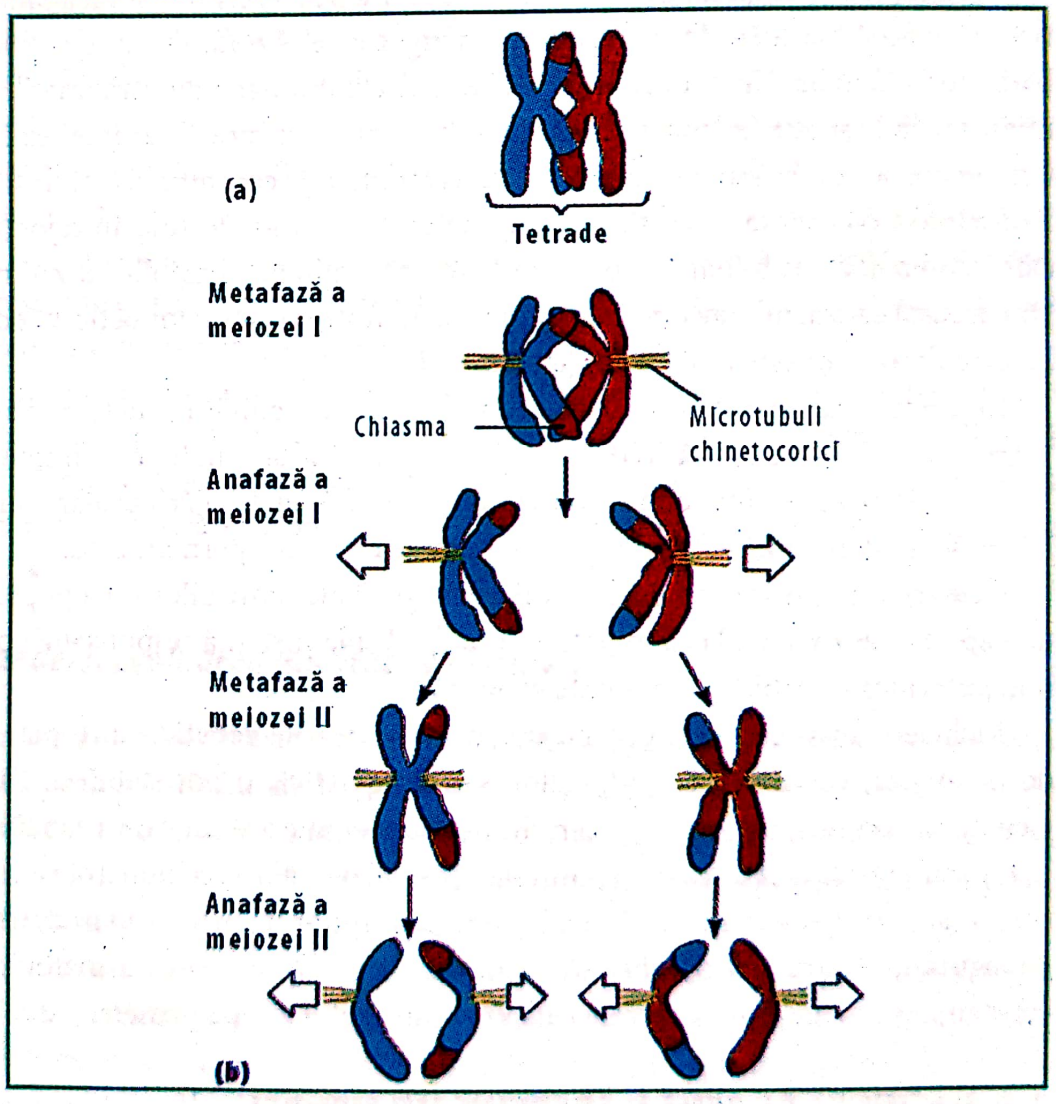


Fig. 60 – Crossing-over
a) În timpul profazei meiozei I perechile de cromozomi omologi neimplicaţi în cromatidele surori se schimbă.
b) În meioză prin crossing-over rezultă cromozomii care conţin material genetic de la ambii părinţi (*prelucrare după Griffith şi colab., 1993*)

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismul exact al acestui proces de împerechere cromozomială denumit **sinapsis** nu este încă cunoscut. Împerecherea cromozomilor omologi este exactă, precisă, adică genele omoloage se află exact față în față.

Crossing-overul are loc numai dacă frecvențele omoloage ale celor 2 cromatide nesurori sunt antrenate, deranjate. La oameni se observă două sau trei fenomene crossing-over pe fiecare pereche de cromozomi. Locul acestui schimb genetic este vizibil în chiasmă la microscopul electronic. Și această recombinare specifică constituie izvorul unei mari variabilități genetice a ciclului sexuat de dezvoltare. Acesta este principalul motiv pentru care frații gemeni nu au material genetic identic. ■

2.5.3. Fecundarea întâmplătoare

Fecundarea întâmplătoare contribuie, de asemenea, la creșterea variabilității genetice în meioză. Să luăm în considerare un zigot care rezultă din împerecherea unui bărbat cu o femeie. Un ovul conține una din cele 8 milioane de combinații cromozomiale posibile și este fecundat de către un spermatozoid care, de asemenea oferă circa 8 milioane de combinații posibile (exact acest număr de combinații este de 8.388.608). Fără a lua în considerare crossing-overul, amândoi părinții produc un zigot (embrion) care reprezintă posibilitatea a 6400 miliarde recombinări posibile (8 x 8 milioane). Din această cauză, nu este deloc de mirare că un frate și o soră pot să fie atât de diferiți. Fiecare dintre noi este în felul său absolut unic.

Recapitulând: reținem deci 3 cauze majore ale variabilității genetice, și anume:

- recombinarea liberă (redistribuția) cromozomilor omologi în timpul meiozei;
- crossing-over între cromozomi omologi în timpul derulării profazei în meioză;
- fecundarea întâmplătoare a unui ovul de către un spermatozoid.

Cele trei mecanisme recombină diferitele gene ale indivizilor unei populații. Într-un capitol viitor vom afla că mutațiile sunt în ultimă instanță responsabile pentru cea mai puternică și stabilă variabilitate genetică.

Încheiem acest capitol cu precizarea că modificările genetice antropice pot mări, de asemenea, variabilitatea indivizilor, sau dimpotrivă, o pot stabiliza. Până atunci trebuie să recunoaștem că deși Darwin n-a cunoscut acest lucru, variabilitatea genetică a stat la baza atât a selecției naturale cât și la evoluția speciilor. Tot ea a fost aceea care a făcut ca fiecare specie să se adapteze condițiilor de mediu. O mutație a condus cu siguranță la apariția omului. Nu știm însă ce va deveni el în următorii 50 de ani când biotehnologiile vor controla existența întregului viu pe planetă. ■

2.6. NOȚIUNEA DE GENĂ ÎI APARȚINE LUI MENDEL

Ochii unor oameni pot fi albaștri, verzi, gri, cărămizii. Părul, la rândul lui, poate avea diferite nuanțe: brun, roșu, blond sau negru. Penele unui papagal ar putea să fie verzi, albastre sau galbene, cu interferențe negre sau gri. Oare de unde apare acest spectru color biologic? Putem să formulăm întrebarea cu caracter absolut general, ca

Scanned with OKEN Scanner

de exemplu: *care este baza genetică a acestei variații la indivizi sau la o populație?* sau *conform căror principii sunt transferate aceste variații de la părinți la urmași?*

O posibilitate de a explica moștenirea ar fi „o ipoteză a amestecului" prin care se înțelege că materialul genetic al celor 2 părinți se amestecă de o așa manieră, cum de exemplu s-ar amesteca albastru și galben pentru a putea obține culoarea verde. Conform acestei ipoteze, ar fi trebuit ca părinții unui papagal albastru și ai unuia galben să conducă la un urmaș verde. Odată amestecat, materialul genetic al ambilor părinți ar trebui să fie inseparabil, asemănător culorii obținută prin amestc. Rezultă că dacă această ipoteză ar fi cea adevărată, ar trebui ca după multe generații din populațiile de papagali albaștri și galbeni să se selecteze o populație de păsări de culoare verde. Rezultatul selecției papagalilor contrazice însă această ipoteză.

Ipoteza amestecului genetic nu poate explica un alt fenomen important, și anume că o situație ca mai sus poate fi observată de abia în generația a 2-a. Alternativa la **ipoteza amestecului** ar fi deci „ipoteza distribuției", a repartiției, moștenirii sau transferului ereditar, ceea ce corespunde și impune „conceptul de gene". Conform acestui transfer, părinții transferă unități genetice directe - denumite **gene** - descendenților, care rămân separați inclusiv în descendență (nu se amestecă). Colecția de gene a organismului seamănă mai mult **cu un vas plin cu bile decât cu un vas plin cu vopsea.** Apare, firesc, întrebarea: Cum ar putea bilele să sorteze genele de la o generație la alta și să le transmită permmanent, fără un efect de diluție a lor?

Genetica modernă s-a născut în câteva ore într-un colț de grădină într-o vreme în care un călugăr pe numele lui Gregor Mendel a experimentat **ipoteza distribuției** materialului genetic, punând bazele transmiterii caracterelor. Experimentele s-au făcut cu plante de mazăre. Transferul cercetărilor la oameni s-a făcut însă cu mare ușurință. ■

2.6.1. Mendel și evaluarea cantitativă în genetică

Se consideră că Mendel este unul din întemeietorii geneticii pentru că el este acela care a descoperit principiile de bază ale eredității. Experiențele sale sunt cunoscute din majoritatea tratatelor de genetică. Vom prezenta în sinteză și foarte schematic rezultatele experiementelor sale, pentru că ele introduc noi cunoștințe despre gene, principalele elemente ale studiului nostru.

Așadar, într-un colț din grădina sa, savantul monah de origine germană Gregor Johann Mendel a făcut primele încrucișări la specia de mazăre (*Pisum sativum*) între plante care aveau flori de culoare albă și flori de culoare purpurie (fig. 61).

În experimentele sale de încrucișare, Mendel a folosit o mică pensulă de pictat pentru a colecta polenul. Prin încrucișarea polenului florilor albe (mascul) cu pistilul florilor purpurii (femelă) au reieșit semințe care în descendență au creat numai flori purpurii. Aceste plante au fost denumite hibrizi de primă generație (F_1). Mendel a făcut și experimentul reciproc, adică polen purpuriu și pistil alb. Regula s-a confirmat, obținându-se numai flori albe.

Scanned with OKEN Scanner

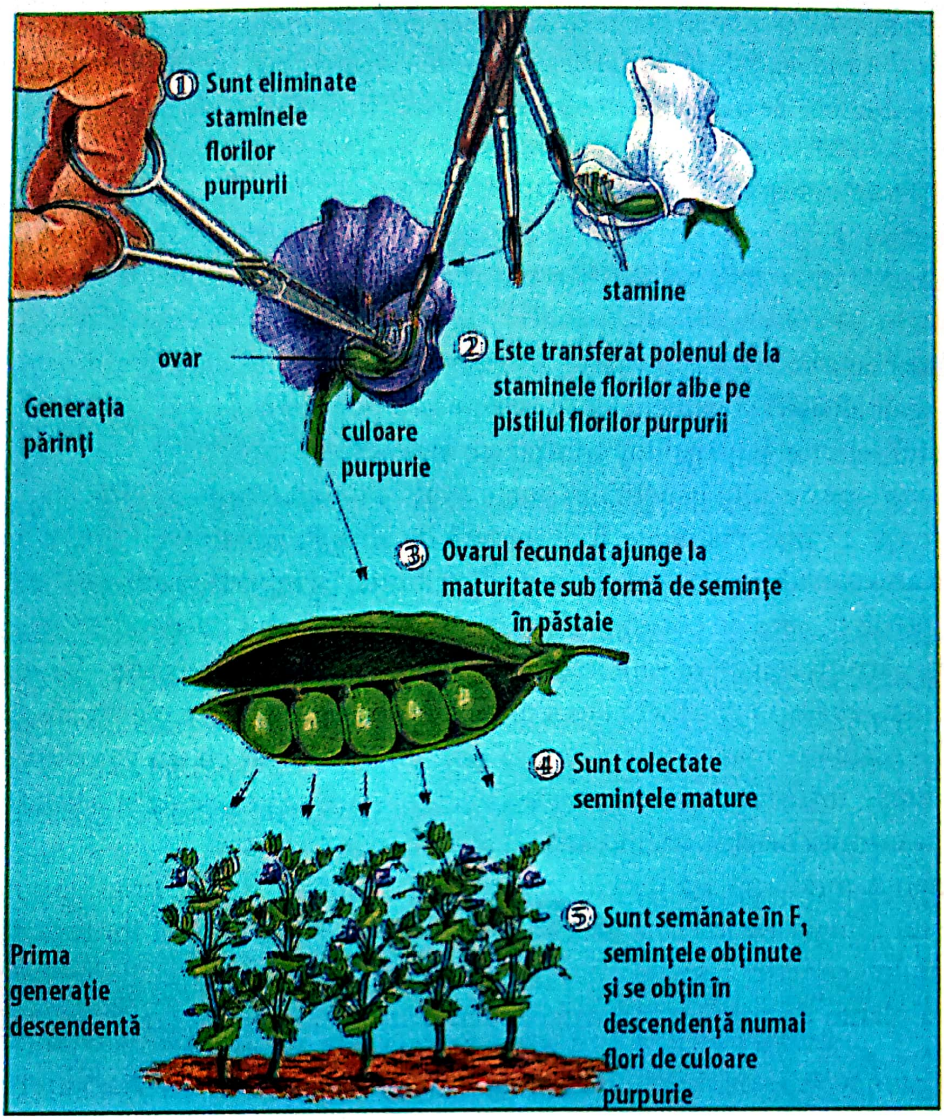


Fig. 61 – Încrucișarea genetică a lui Mendel (*Campbell A.N., 2000*)

Ca termeni noi reținem **hibridarea**, încrucișarea între două varietăți ale aceleiași specii, iar ceea ce rezultă sunt numiți **hibrizi** adică indivizi obținuți prin amestecul genetic al acestora. Rezultatul acestei hibridări, așa cum s-a văzut, reprezintă un singur caracter - în acest caz culoarea florilor. Dacă notăm cu P generația de părinți care cuprinde materialul genetic pur, vom nota cu F_1 primul hibrid din filiație. Dacă vom colecta și însămânța și semințele obținute din F_1 în anul următor vom obține generația F_2. Mendel a urmărit transmiterea însușirilor ereditare pe durata a 3 generații adică P, F_1 și F_2. Dacă Mendel și-ar fi întrerupt experimentul după F_1, nu ar fi putut elabora legile de bază ale eredității. Hotărâtoare pentru experimentele lui Mendel au fost plantele din F_2, care i-au dat posibilitatea descoperirii a 2 legi genetice - Legea separării și Legea independenței caracterelor. Cea de-a 3-a lege - cea a uniformității nu are însă statut de lege genetică, fiind subordonată celorlalte. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.6.2. Legea separării caracterelor

REȚINEȚI!

Conform acestei legi, amândouă **alelele** destinate unui anumit caracter ajung în gameți separați.

DEFINIȚIE

Alelă = formă de existență, de stare a unei gene, definiție ce trebuie reținută. Mai poate fi denumită ca o secvență genetică care transmite un „caracter", o însușire.

Dacă ipoteza amestecului de material genetic ar fi adevărată, plantele hibride din F_1 ar fi format atât flori purpurii cât și albe într-o proporție aproximativ egală.

După cum reiese însă din figura 61, experimentul a demonstrat că în generația F_1 s-au format fără excepție numai flori purpurii. Această unitate, uniformizare, Mendel a denumit-o grăbit Legea uniformității, adică „la un monohibrid toți indivizii generației F_1 sunt egali între ei." Ce s-a întâmplat însă cu informația genetică aparținând florilor albe la părinți? Dacă ar fi fost pierdută, ar fi trebuit ca și în F_2 să se obțină, de asemenea, numai plante cu flori purpurii. Experimentul lui Mendel a arătat însă că în F2 florile cu culoare albă reapar. Mendel a fost foarte exact și numărând plantele a constatat că din totalul de 929 plante în F_2:

- 705 au deținut flori purpurii;
- 224 au avut flori albe.

Rezultă deci un raport de cca 3:1 între florile purpurii și cele roșii (fig. 70).

A fost foarte clar că în F_1, materialul genetic al florilor albe nu a fost pierdut, ci în plantele hibride F_1 a dominat exclusiv factorul culoare purpurie pentru flori. În terminologia lui Mendel culoarea purpurie era **forma caracteristică** dominantă, iar albul era **forma recesivă**.

Reapariția plantelor cu flori albe în F_2 a demonstrat că materialul genetic pentru factorul cu caracter recesiv nu a fost total diluat. Mendel, continuându-și cercetările, a constatat același model de transmitere a caracterelor și pentru alte 6 forme caracteristice (fig. 62).

Așa cum se observă din figura 63, un raport 3:1 în generația F_2 a înregistrat Mendel și la alte caractere cum ar fi: forma bobului (rotundă x ridată), dominantă fiind forma rotundă; așezarea florilor (axial x terminal), dominanta fiind axial etc. Ceea ce n-a știut Mendel atunci și l-a denumit **factor ereditar** se cunoaște bine astăzi și va fi denumit **genă**.

Câteva concluzii ale cercetărilor mendeliene judecate de cercetătorii de astăzi:

1) Alele alternative unor gene condiționează variabilitatea genetică a caracterelor ereditare. S-a văzut că genele care imprimă culoarea există în 2 versiuni, una pentru culoarea purpurie și alta pentru culoarea albă a florilor.

Alele mai pot fi definite și ca versiuni alternative ale aceleiași gene. Astăzi acest concept al genelor poate fi corelat cu cel de cromozomi și ADN, așa cum s-a văzut

Scanned with OKEN Scanner

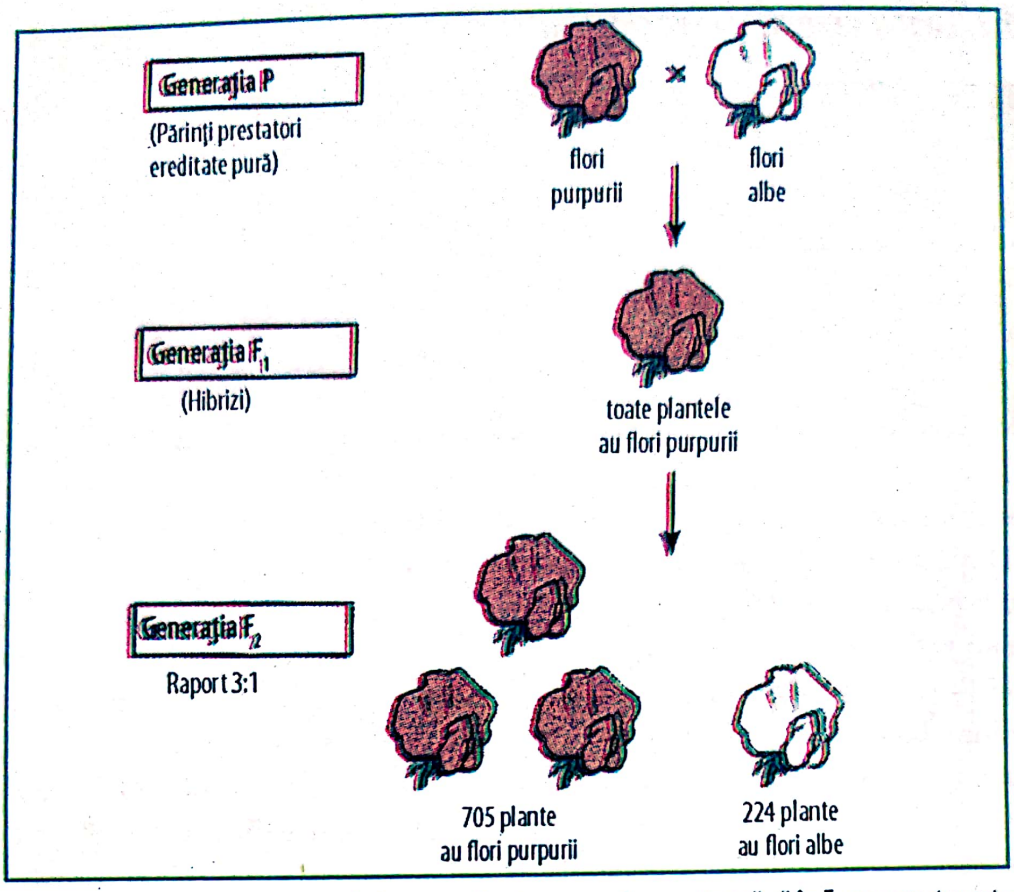


Fig. 62 – Experimentul lui Mendel urmărit în 3 generații prin care se demonstrează că în F_1 un caracter este ascuns, dar că în F_2 acesta revine, raportul între cele două fiind de 3:1

într-un capitol anterior. O genă cu un anumit caracter se află pe cromozom pe o anumită poziție (loc). Secvența ADN pe acest spațiu poate totuși să varieze întrucâtva și odată cu acest fenomen se schimbă și conținutul informațional al genelor. Cele 2 alele mai sus descrise reprezintă 2 variante ADN ale caracterului „culoare flori" pe un cromozom al mazării.

2) Pentru fiecare caracter organismul deține două alele, câte una pentru fiecare părinte. Mendel a descoperit acest lucru experimental fără ca el că știe ceva despre rolul cromozomilor. Cunoștințele noastre actuale despre cromozomi ne ajută să înțelegem fiecare pas din rezultatele mendeliene.

Așa cum ne este deja cunoscut, organismele diploide dețin perechi de cromozomi omologi, proveniența lor fiind unul de la mamă și celălalt de la tată. Acesta este motivul pentru care fiecare locație a genei este prezentă de 2 ori în celula diploidă. Aceste locuri, poziții omologe nu pot purta decât alele identice, așa cum deja s-a constatat la linia pură genetică de mazăre a lui Mendel. Ambele alele pot să fie diferite, cum s-a constatat la F_1 - hibrid. În experimentul privind culoarea florilor plantele hibride au primit o alelă pentru culoarea purpurie de la un părinte și alta pentru culoarea albă de la celălalt părinte. Acest aspect a condus la a 3-a concluzie a teoriei, și anume:

3) **Dacă alele sunt diferite, atunci numai una, și anume alela dominantă, se va exprima complet, cealaltă, cea recisivă nu-și face în nici un fel simțită prezența.** Se vorbește în acest caz despre o mișcare ereditară dominant recisivă.

Scanned with OKEN Scanner

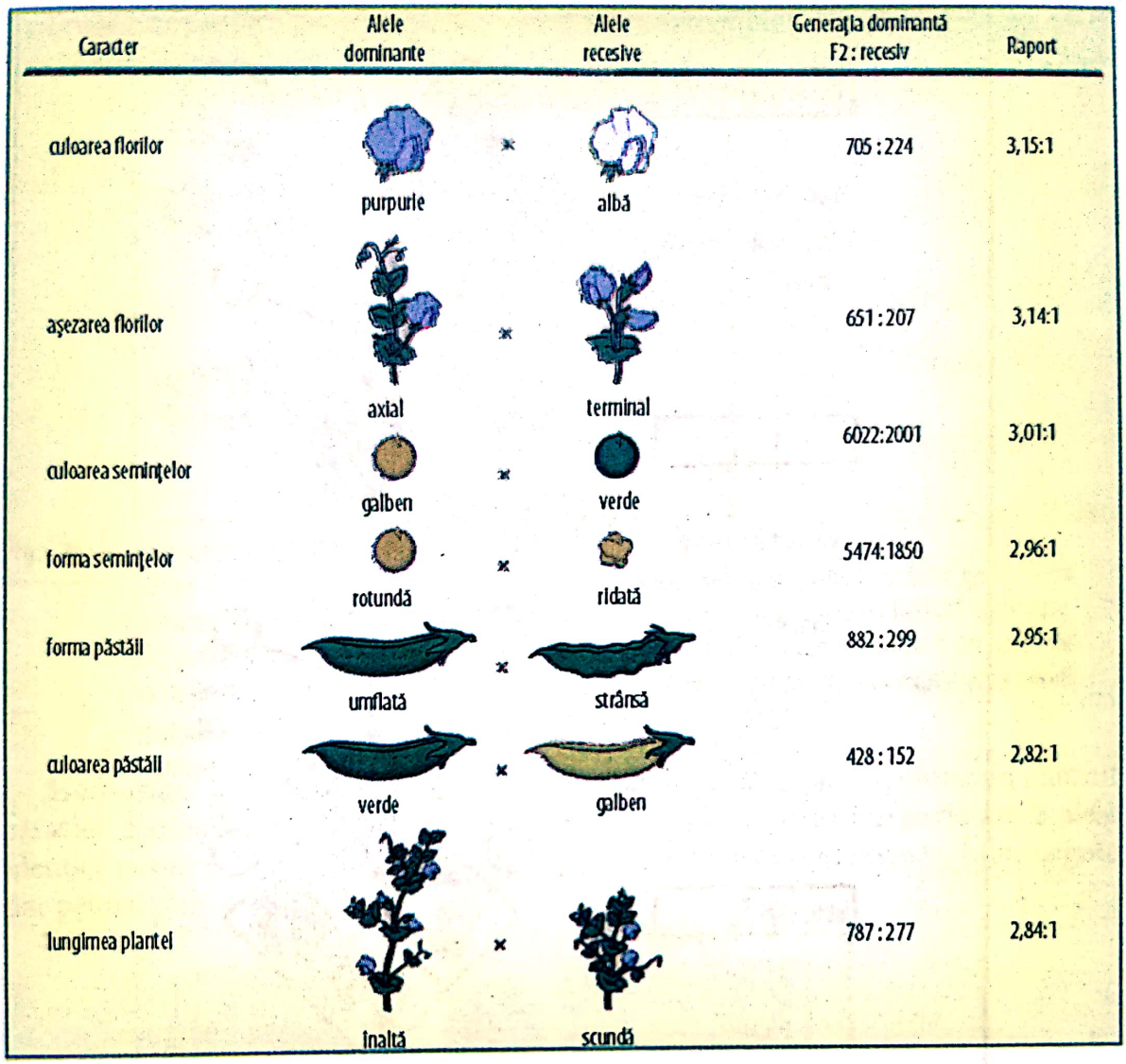


Fig. 63 – Rezultatele în F_2 ale încrucişării mendeliene la mazăre pentru 6 caractere

4) Cele 2 alele ale fiecărui caracter segreghează (se despart) la formarea gameţilor. Din aceste motive o celulă ovul sau una spermatică conţine numai una din cele două alele, care altminteri se găsesc în 2 copii ale celuelor somatice ale organismului. La mazăre celulele spermale provin din grăunciorii de polen.

Dacă transcriem evenimentul la cromozomi, acesta corespunde separării sau segregării, reducţiei numărului de cromozomi de la setul diploid la cel haploid în timpul meiozei. La un organism cu 2 alele identice, adică la un organism cu o ereditate pură nu există decât un singur fel de gameţi. Dacă însă sunt prezente diferite alele cum este cazul hibrizilor în F_1, atunci 50% din gameţi conţin pe cea dominantă şi 50% pe cea recesivă.

Această parte a ipotezei lui Mendel - „scindarea" diferitelor alele la două feluri de gameţi este prima Lege a lui Mendel, aşa-numita **regulă a scindării**.

Un test pe care regula segregării (scindării) ar trebui să-l treacă este acela dacă raportul de 3:1 în generaţia F_2 poate fi cumva explicat. Conform acestei legi, hibrizii în F_1 produc 2 clase (feluri) de gameţi. Analizând combinaţiile posibile de polenizări pe care, din motive de spaţiu nu le mai reproducem aici, vom prezenta însă figura 64 care explică în detaliu legea.

Scanned with OKEN Scanner

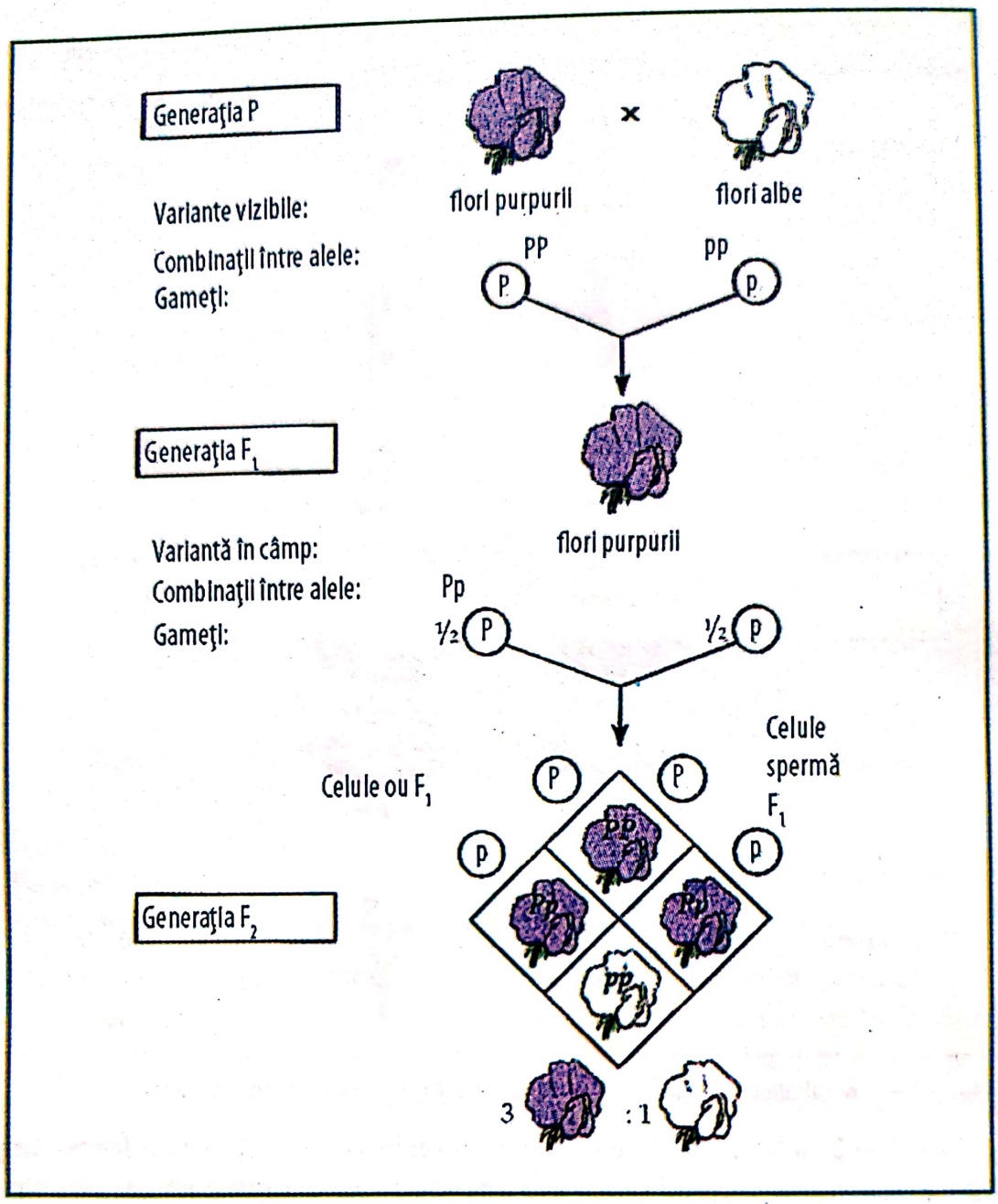


Fig. 64 – Regula segregării

Este o versiune detaliată a transmiterii ereditare prin procedeul hibridării. Cu „P" este notată alela culorii purpurii, adică a alelei dominante (vezi şi fig. 62), iar cu „p" alela recisivă a culorii albe. Fiecare plantă conţine cele 2 alele care controlează culoarea florilor. De la fiecare părinte este moştenită alela unei gene. Fiecare plantă pură a generaţiei parentale deţine alele identice, fie PP (culoare purpurie), fie pp (culoare albă). Gameţii simbolizaţi prin cercuri conţin numai o alelă a genelor culorii florilor. Prin unirea celor 2 gameţi părinţi se ajunge în generaţia F_1 la o combinaţie cu alele diferite de tip Pp. Deoarece, alela pentru culoare purpurie P este dominantă, toate plantele hibride obţinute vor avea culoarea purpurie. De îndată ce hibrizii produc gameţi, alelele se separă şi ele. Asta înseamnă că jumătate din gamet conţine alela P, iar celaltă alela p. Combinaţia întâmplătoare a acestor gameţi conduce la o segregare de 3:1 exact aşa cum a constatat Mendel în F_2. În cele 4 pătrăţele din figură sunt reprezentate aceste posibilităţi de apariţie a însuşirilor în generaţia a 2-a F_2 (*după Mendel*)

Scanned with OKEN Scanner

Poate este potrivit aici să explicăm câteva noţiuni.
Ce sunt de fapt **alelele** (fig. 65)?

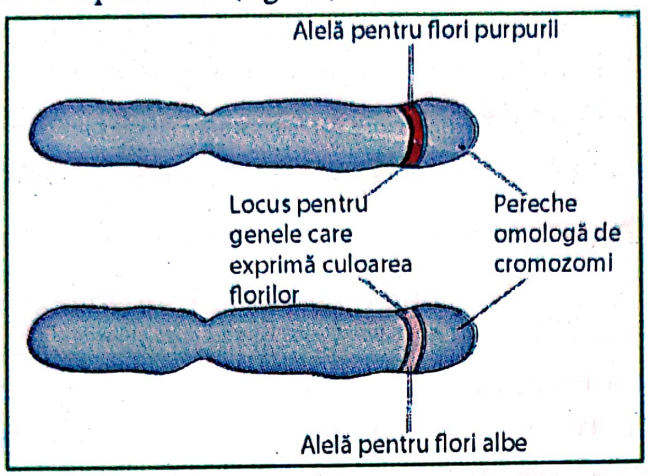


Fig. 65 – Cromozomi omologi purtând alele diferite.
Se pot defini alelele, aşa cum s-a mai spus, ca forme diferite de existenţă ale unor gene. Gena construită pentru exprimarea unui caracter ereditar, în cazul nostru „culoarea florilor" la mazăre. Ele, genele ocupă un loc special în cromozom denumit **locus**. Alelele ar mai putea fi deci definite ca variante ale unei gene. În acest caz există 2 versiuni ale genei care se ocupă de exprimarea culorii (purpuriu, P + alb, p)

Homozigot reprezintă un organism care deţine 2 alele identice pentru un anumit caracter. Exemplu acea plantă de mazăre care pentru culoarea purpurie are 2 alele identice curate „PP". Plantele de mazăre cu flori albe sunt, de asemenea, homozigote dar pentru alele recisive (pp) (fig. 66).

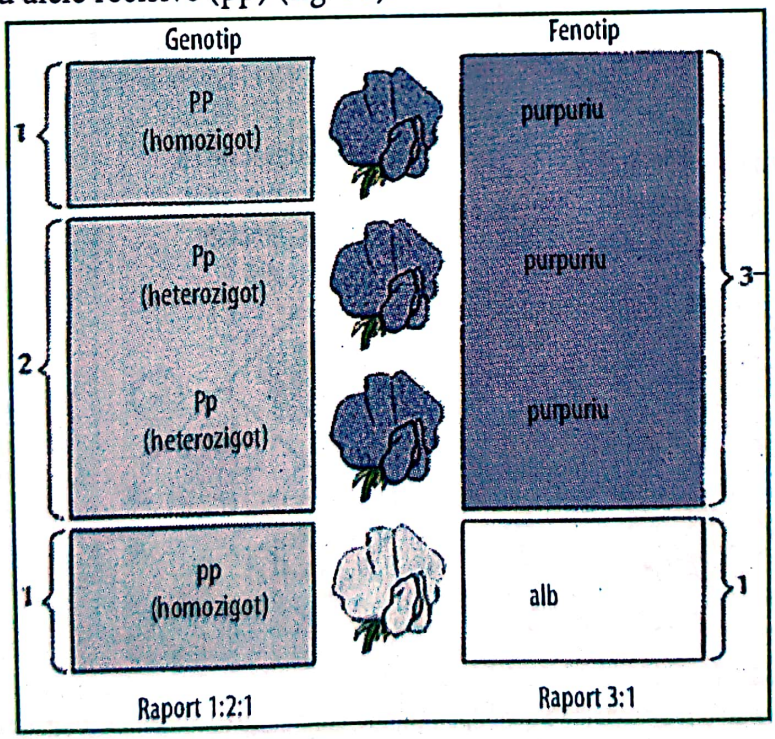


Fig. 66 – Genotip şi fenotip.
Prin încrucişarea unor homozigoţi dominanţi cu cei recisivi, descendenţii primesc şi combinaţii diferite de alele Pp (generaţia F_1) pentru un singur caracter. În acest caz, adică atunci când 2 alele exprimă acelaşi caracter, avem de-a face cu plante heterozigot (*după Mendel – interpretare*)

Scanned with OKEN Scanner

Aceste plante nu sunt curate ca material moştenit, ci dimpotrivă, au material genetic amestecat. De aceea, nu există o corelaţie directă între **genotip** şi **fenotip**. Fenotipul este ceea ce se vede în câmp, culoare purpurie sau albă (nicidecum amestecată).

Genotipul reprezintă materialul genetic care stă în spatele fenotipului. Un anumit fenotip poate avea o conformaţie morfologică care să imprime o anumită fiziologie sau biochimie a organismului. ■

2.6.3. Încrucişare recisivă (Ruckkreuzung)

O plantă de mazăre purpurie al cărei fenotip provine dintr-un genotip homozigot va transmite în descendenţă numai flori purpurii. Acelaşi lucru se întâmplă cu gametul heterozigot care are flori tot purpurii. Pentru a stabili cu exactitate din ce fel de gamet provine planta cu flori purpurii se face un nou test de încrucişare cu fenotipul slab - recesiv (pp - culoare albă). Dacă florile care apar în descendenţa F_1 vor fi roşii, am pornit cu un homozigot, iar dacă florile sunt jumătate albe şi jumătate roşii, adică raportul este de 1:1, atunci am pornit cu un genotip heterozigot (Pp) (fig. 67).

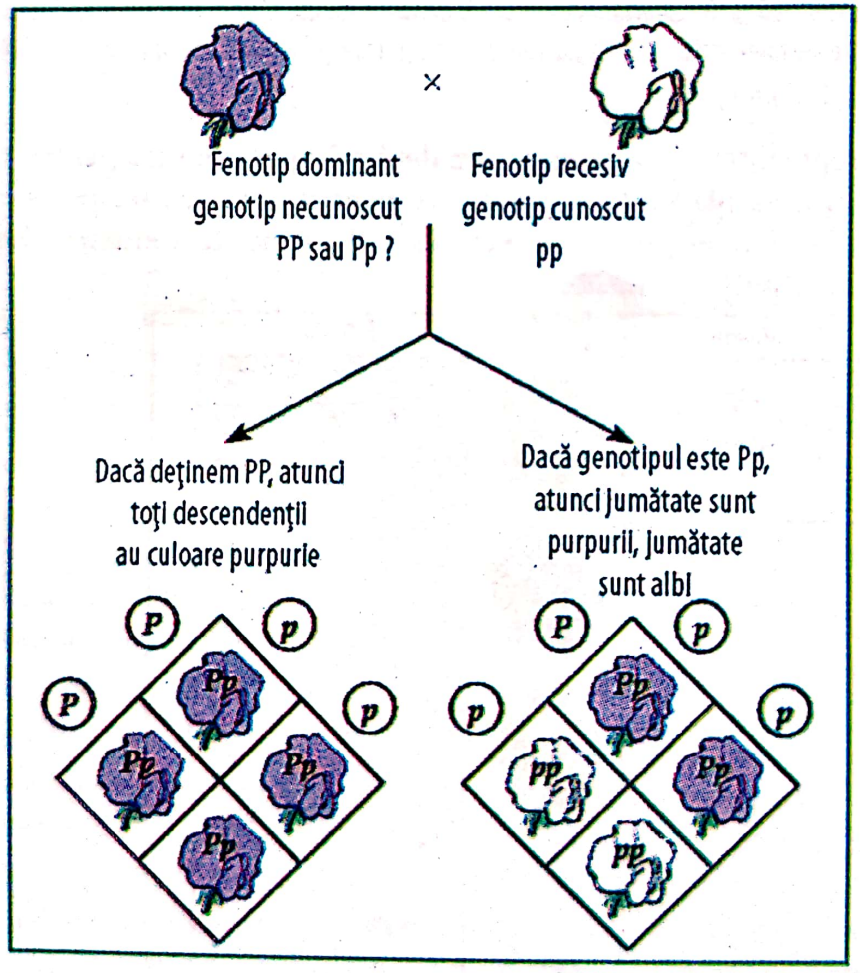


Fig. 67 – Încrucişare recesivă.
Se utilizează ca un test de stabilire a genotipului atunci când nu se cunoaşte constituţia genetică a fenotipului dominant. Genotipul necunoscut se stabileşte prin încrucişarea gametului fenotipului care i-a dat naştere cu un gamet al unui fenotip recesiv homozigot, în cazul nostru flori albe (*după Mendel*)

Scanned with OKEN Scanner

DEFINIȚIE

Definim deci **încrucișarea recesivă** ca fiind **„un test de încrucișare al unui homozigot recisiv cu un organism ce are un fenotip dominant, dar un genotip necunoscut"**. Conceptul a fost introdus de Mendel și este încă foarte actual astăzi în practica genetică.

2.6.4. Legea sau regula independenței sau nedependenței

Conform acestei legi, în cazul formării gameților, diferitele alele perechi segregă independent una de alta. Această regulă apare în cazul unor încrucișări dihibride. Prin încrucișările dihibride se urmărește deci modul în care sunt transmise în descendență două caractere.

Mendel a studiat cele 2 ipoteze, și anume:

- I_1 - caracterele se transmit împreună;
- I_2 - caracterele se transmit independent unul de altul.

Dacă se iau în considerație caracterele, culoarea seminței, să-i spunem galbenă și o notăm cu „G" și verde cea recesivă pe care o notăm cu „g" și dacă luăm în considerație al 2-lea caracter - forma seminței în varianta dominantă o notăm cu „R" (rotundă) și neuniformă, grunjoasă și o notăm cu „r" atunci prin încrucișarea fenotipurilor dominante părintești rezultă genotipuri GGRR și pentru cele recesive ggrr.

Prin încrucișarea lor, Mendel a demonstrat că alelele, caracterele se transmit independent conform desenului din figura 68.

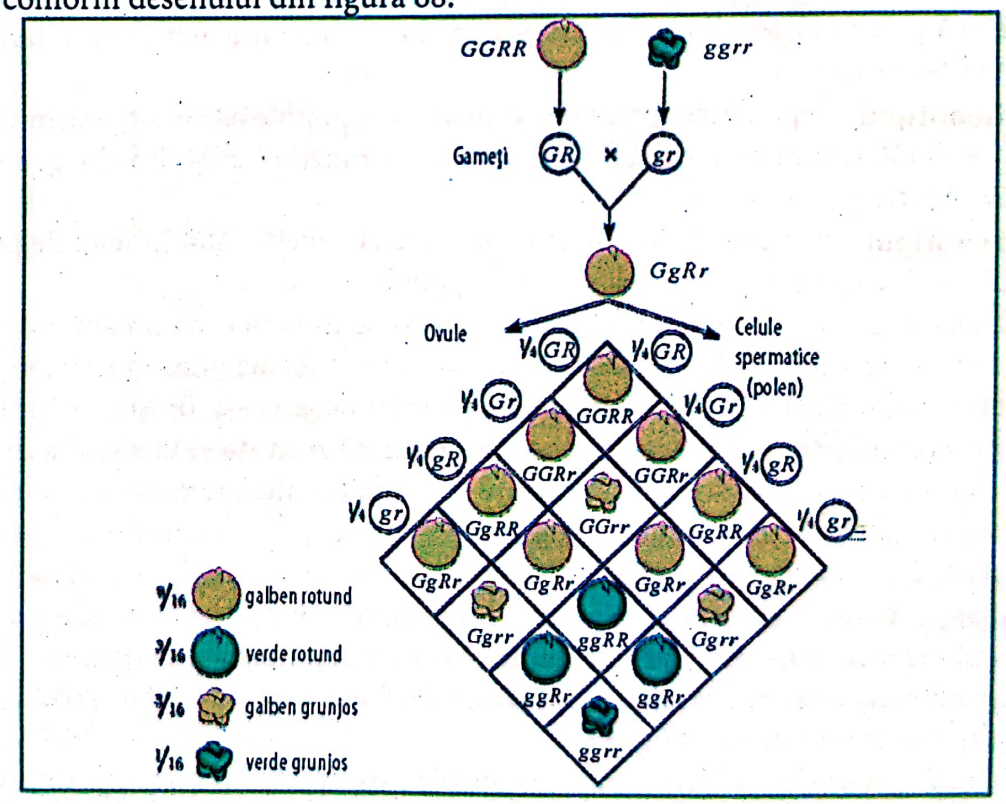


Fig. 68 – Segregarea independentă a alelelor.
O încrucișare între plante pure părintești care se deosebesc prin cele 2 caractere. Se ajunge în F_1 la hibrizi care sunt heterozigoți pentru amândouă caracterele. Deoarece amândouă caracterele segregă independent unul de altul în F_1 se obțin 4 combinații de gameți, iar în F_2 se ajunge la o separare a fenotipurilor în raport de 9 : 3 : 3: 1 (*după Campbell și colab., 2003*)

Scanned with OKEN Scanner

Urmare a acestor rezultate, descoperirile genetice ale lui Mendel au condus la aplicarea în genetică a **legilor probabilității**. Fără a intra în detalii, pentru că ele nu-şi găsesc locul în această prezentare, precizăm totuşi că legile genetice ale segregării şi independenței în segregarea alelelor constituie domenii cu aplicare specială în statistică, mai ales în teoria probabilității pentru că analizele genetice pentru a putea fi bine înțelese necesită din partea celor care le utilizează cunoştințe temeinice de statistică. ■

2.6.5. Genele mutante

Dacă pornim de la alelele lui Mendel care sunt forme de manifestare ale aceleiaşi gene, ne putem imagina că marii geneticieni care i-au urmat lui Mendel au analizat fenomenul inducerii mutațiilor la gene pentru a obține noi forme de organisme care vor fi denumite către sfârşitul secolului **Organisme Modificate Genetic**. Chiar şi un organism bolnav de cancer este un **OMG** pentru că, aşa cum vom vedea, acesta este indus de anumite **gene** denumite **mutante**. **Mutațiile** nu sunt altceva decât modificări secvențiale, care ar putea conduce fie la pierderea unor proteine codante (deținătoare a unor informații), fie la modificarea acestor structuri. Apariția mutantelor într-un organism conduce cu siguranță la modificarea tabloului organismului în cauză. Mutantele induc organismului caractere determinate de modificarea proteinelor şi a unor structuri specifice care le fac ca noile organisme să se deosebească de cele naturale, uneori fenotipic, dar cel mai adesea funcțional.

Dacă privim acum din punct de vedere al structurilor genetice, unii termeni trebuie redefiniți, şi anume:

Genotipul - reprezintă totalitatea genelor care populează un organism şi care, aşa cum s-a arătat, sunt foarte bine organizate în cromozomi ca şi din alte gene libere în celule (foarte puține).

Fenotipul - reprezintă modul de exprimare al genelor, atât în felul de prezentare fizică (tabloul) organismului cât şi în funcționalitatea sa.

Dacă în genotipul unui organism există o genă mutantă sau un anumit număr de gene mutante, acest lucru se transmite în fenotip sub forma unor modificări fizice sau funcționale, uneori pozitive, dorite de noi, alteori negative şi, firește, nedorite de om.

Revenind iarăşi la **alele**, putem acum să afirmăm că fie şi în situația în care una din diferitele forme ale aceleiaşi gene este mutantă **tot alelă** se numeşte; cele 2 noțiuni de homozigot şi heterozigot au acelaşi înțeles chiar dacă cuvântul alelă este înlocuit cu genă. La organismele diploide fiecare genă ocupă 2 poziții, 2 copii adică 2 alele similare şi în acest caz organismul este homozigot. În cazul mutațiilor recesive însă amândouă alelele trebuie să fie mutante pentru a determina un organism, de asemenea, homozigot dar cu alt fenotip. Organismele heterozigote ca şi în cazul lui Mendel conțin 2 alele diferite (vezi fig. 68).

Dacă însă dorim să observăm fenotipurile care apar prin încrucişcarea unui individ normal cu unul care conține o mutantă, vom întâlni următoarele situații:

a) O mutație este dominantă, iar alela trebuie să fie recisivă (Mendel nu vorbea deloc de mutații). În acest caz se întâmplă următoarele: jumătate din gameții unui individ, care conține mutația dominantă poartă alela normală, iar cealaltă jumătate poartă alela mutantă (A/a) (fig. 69).

Scanned with OKEN Scanner

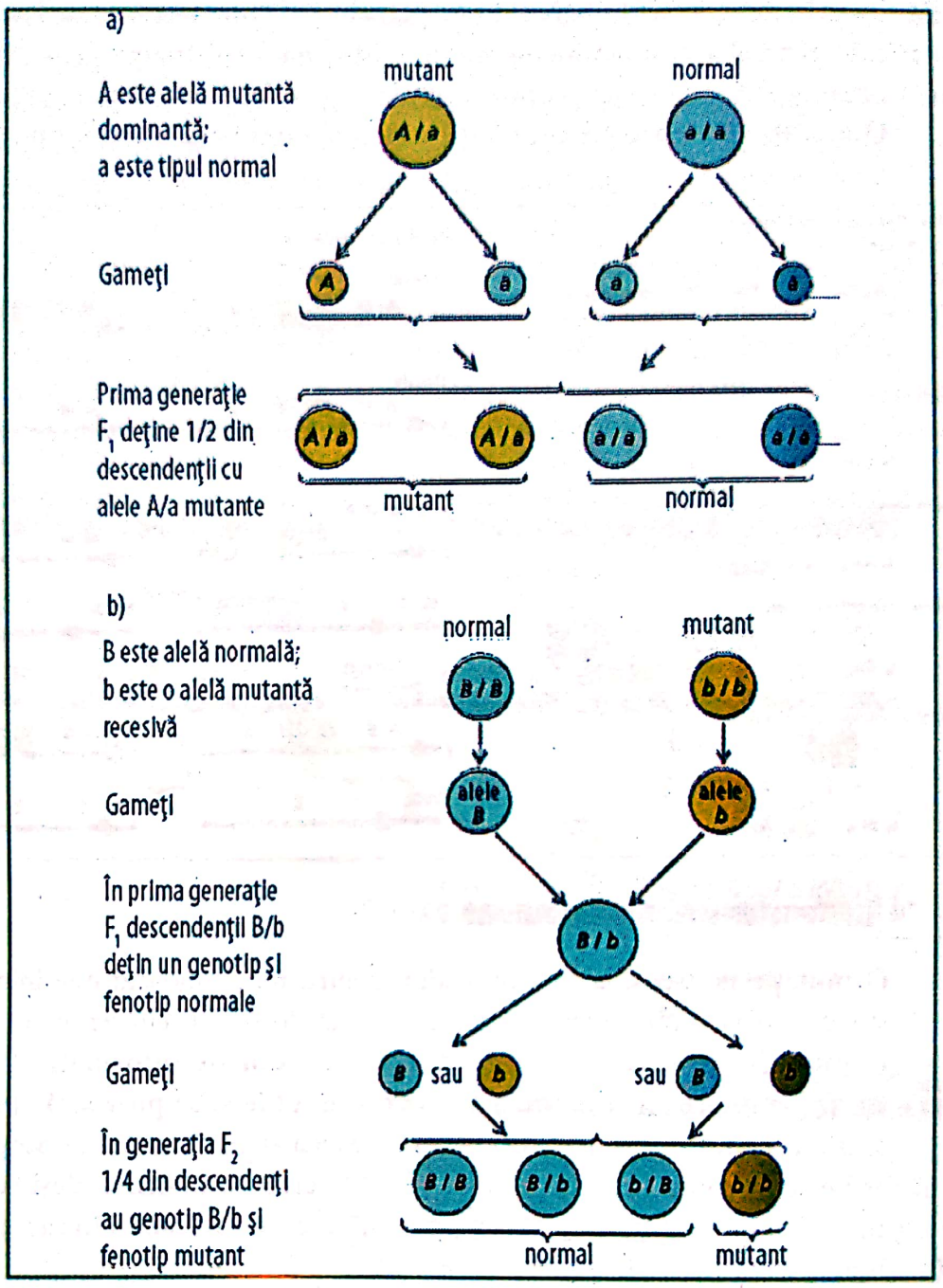


Fig. 69 – Model de segregare a mutaţiilor dominante şi recesive.
Urmaşii încrucişărilor între indivizii genotipic normal (albastru) şi mutantele (galben), care reprezintă un homozigot (A). Mutanta dominantă şi un homozigot (b) mutanta recesivă, produc în descendenţă F_1 anumite raporturi între fenotipurile normale şi mutante A/a va fi un fenotip mutant şi B/b unul normal. După încrucişări generaţia a 2-a B/B, B/b, b/B vor fi normale şi b/b va fi mutant (*prelucrare după Mendel*)

2.6.5.1. Cum apar mutaţiile

Mutaţiile apar prin 2 metode:

1) **Modificări mai mari sau mai mici ale ADN-ului**, sau prin modificări care oricum sunt esenţiale pentru ca acest lucru să se întâmple. Dacă prin schimbul unei singure perechi de baze azotoase, care în mod obişnuit este denumită **mutaţia punc-**

Scanned with OKEN Scanner

tuală sau prin deleţia (schimbarea) unor perechi puţin numeroase de baze rezultă o mutaţie, în general aceasta influenţează funcţionarea unei singure gene. Modificările într-o singură pereche de baze ar putea conduce la 3 tipuri de mutaţii (fig. 70):

- **O mutaţie Misense** provocată de înlocuirea unui aminoacid dintr-o proteină cu un altul.

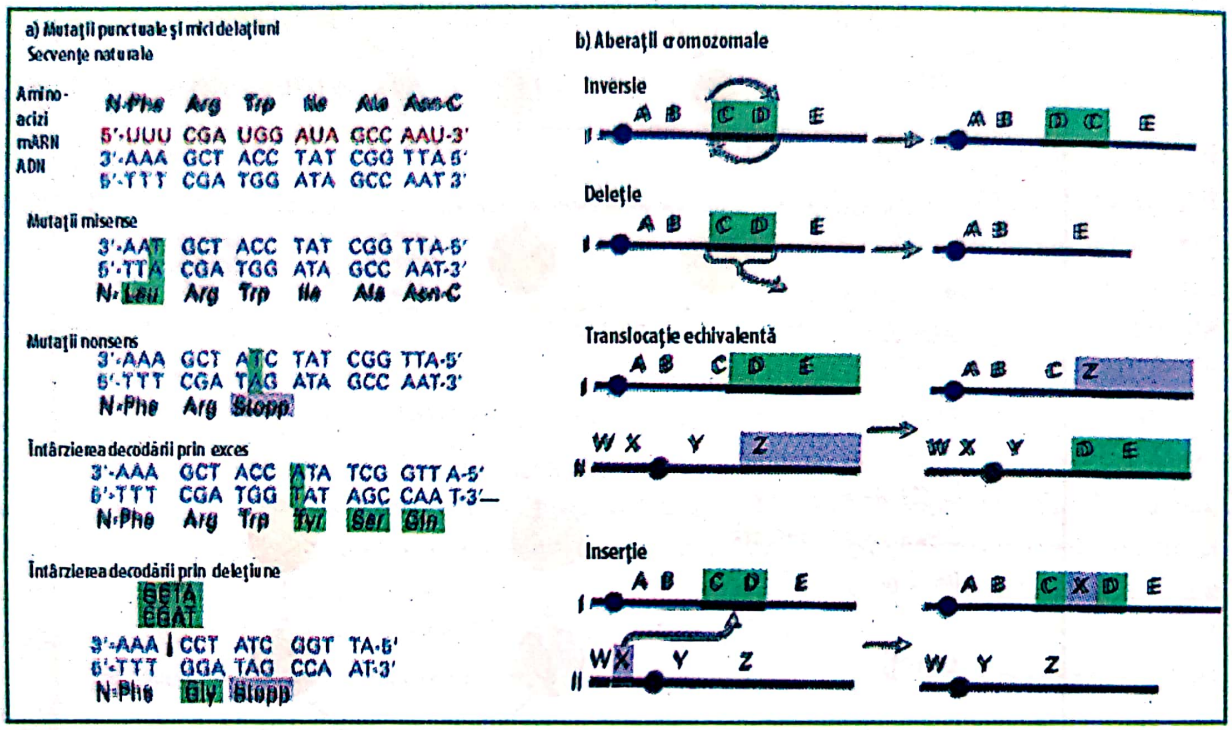


Fig. 70 – Diferite feluri de mutaţii (*Lodish şi colab., 2001*)

- **O mutaţie nonsens**, la care un codon pentru un aminoacid este înlocuit cu un stopcodon, iar aminoacidul util nu se mai poate forma prin întreruperea translaţiei.
- **O mutaţie tip întârziere, introducere decodor de informaţii**. În acest caz are loc o întârziere a decodării informaţiei utile şi se provoacă apariţia unor aminoacizi falşi, alţii decât cei necesari, adică apare în avans un stop codon:

Deleţiile scurte au aceeaşi acţiune ca şi întârzierea decodorilor, deşi la 1/3 dintre ele acţiunea de citire a informaţiilor poate rămâne activă în cazuri în care producerea la întâmplare a aminoacizilor este îndepărtată.

2) A doua categorie de mutaţii apare prin **modificarea structurii cromozomale**. Funcţiile cromozomilor sunt influenţate de foarte numeroase gene, cu urmări în crearea unor fenotipuri, cu pondere mult diferită unul faţă de altul.

Asemenea mutaţii cromozomale sau aberaţii cromozomale pot să conducă la numeroase sau foarte numeroase deleţii sau inserţii create de genele corespunzătoare mutante. Faţă de primul procedeu în care aveam de-a face cu modificări de secvenţe proteice, respectiv baze azotoase sau aminoacizi într-o singură genă, în cazul mutaţiilor cromozomale suntem confruntaţi cu una din următoarele situaţii (fig. 71):

- modificări ca la punctul 1), dar la mai multe gene ale cromozomului;
- inversări ale genelor pe cromozom;
- schimbări ale unor mari segmente de ADN între cromozomi neomologi. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.6.5.2. Cum se induc, cum se creează mutaţiile

Există trei mecanisme de inducere a mutaţiilor.

1. Inducere spontană, datorită unor evoluţii greşite ale replicării ADN.
2. Induceri cauzate de factori fizici şi chimici.
3. Inducere dirijată prin biotehnologii bine elaborate.

1) În ADN-ul multor organisme, inclusiv în cel al omului, bazele azotoase care alcătuiesc **purinele** şi **pirimidinele** se dovedesc adesea a avea o anumită instabilitate chimică. Acest lucru conduce implicit la greşeli în replicarea ADN-ului, greşeli care induc natural mutanta. În figura 71 se prezintă un asemenea sistem de mecanisme.

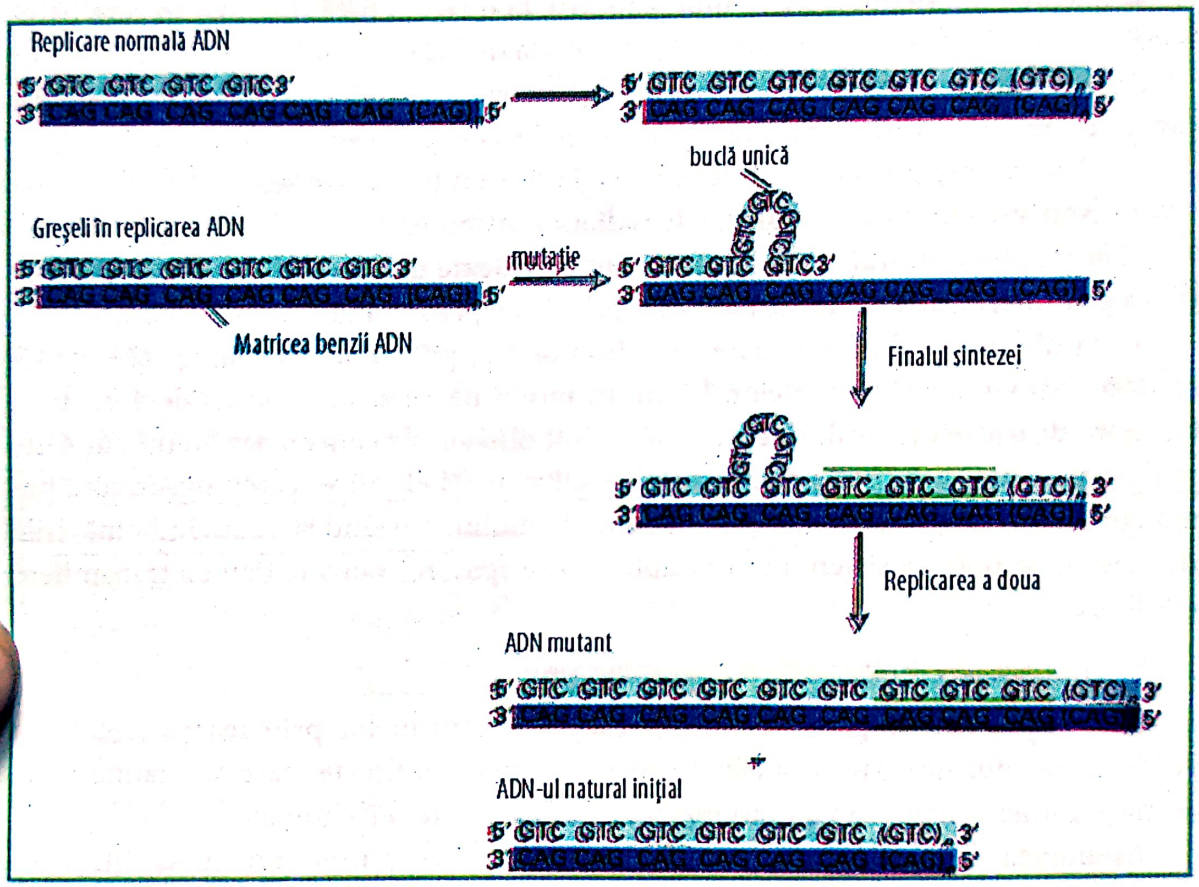


Fig. 71 – Unul din mecanismele inducerii spontane a mutaţiilor prin replicarea greşită a ADN-ului (*după Lodish şi colab., 2001*)

O eroare de replicare poate să apară în domeniul ADN mai ales atunci când secvenţele proteice asemănătoare se înşiruie una după alta.

În desen este exemplificat pe situaţia GTC (Guanină - Timină - Cistină) al cărui lanţ rezultat dintr-o coloană ADN (albastru-deschis) poate forma o singură buclă. Prin acest fenomen banda rezultată este împinsă în spatele matricei coloanei respective (albastru-închis) cu toate că secvenţa 3^1 cap de bandă rămâne întotdeauna împerecheată cu matricea. De aceea, enzimele sintetizate de ADN copiază a doua oară o secvenţă a matricei coloanei.

Scanned with OKEN Scanner

Rezultă deci (fig. 71) că, coloana se prelungeşte practic cu 3 nucleotide noi (marcate cu galben). În runda ulterioară a replicării ADN-ului rezultă o moleculă dublu-coloană (dublu elicoidal) cu o secvenţă de ADN normal şi o altă secvenţă dublu coloană mutantă cu un surplus de nucleotizi.

2) A doua categorie de mutaţii este cea indusă prin factori de mediu. Ele apar atunci când organismele sunt supuse razelor ultraviolete, alternanţelor şi amplitudinilor mari de temperatură sau anumitor substanţe chimice cum ar fi micotoxinele (Aflatoxin b1) şi multe altele. O cauză foarte frecventă a inducerii unor mutaţii punctuale o constituie dezaminarea **citosinului în uracil** în coloanele dublu helixului (dublu elicoidal).

Replicarea ulterioară a ADN-ului conduce la o celulă fiică mutantă în care perechea de baze T - A înlocuieşte perechea normală de baze C - G.

Pentru a induce mutaţiile cu o frecvenţă mare în experimente există mai multe procedee, rezultate din principiile teoretice mai sus exprimate:

- Tratarea organismelor cu doze mari de substanţe carcinogene.
- Aplicarea unor doze ridicate de radiaţii ionizante.

În general însă **mutaţiile punctuale sunt provocate mai ales de substanţe chimice** în timp ce **aberaţiile cromozomiale** sunt provocate predominant de razele ionizate.

Mutaţiile pot să fie folositoare sau, dimpotrivă, pot să aducă mari probleme de sănătate oamenilor şi animalelor. În lumea modernă de astăzi se consideră că două categorii de cauze determină cele mai mari îmbolnăviri de cancer, dar nu numai. Cele mai importante sunt problemele create de substanţele chimice carcinogene care pot ajunge uşor în lanţul alimentar şi metabolic al omului, cauzând 80% din îmbolnăvirile de cancer, de boli ale sistemului imunologic (de apărare) sau alte boli cu transmitere ereditară.

Inducerea mutaţiilor de către substanţe chimice carcinogene

Substanţele carcinogene acţionează asupra organismelor prin reacţii directe cu ADN-ul (acidul dezoxiribonucleic) sau prin reacţii indirecte, care se manifestă ca urmare a unei activări sau a unui metabolit al substanţei incriminate.

Asemenea chimicale, care nu sunt puţine, dar relativ puţine sunt cunoscute, constituie probabil principala cauză a îmbolnăvirilor cu diferite feluri de cancer. Experimentul „clasic" pentru determinarea efectului carcinogenic al unei substanţe constă în aplicarea repetată, prin întindere, pe spatele unui şoarece a substanţei ce se vrea testată şi apoi căutarea tumorilor specifice în organismul animalului.

În felul acesta, dar şi prin alte metode, au fost identificate numeroase substanţe carcinogene şi s-a constatat că acestea sunt implicate într-un spectru larg de structuri canceroase, fără a fi posibilă recunoaşterea indiciilor, a caracterelor comune. Cercetătorii în domeniul biologiei moleculare împart aceste substanţe în două grupe mari (*Lodish şi colab.* în „Biologie celulară şi moleculară", Editura Spectrum, 2001) prezentate în figura 72 (fig. este completată de autor).

Substanţele carcinogene cu acţiune directă nu sunt altceva decât legături reactive electrofile, care se cuplează de alte molecule încărcate negativ. În cazul unei reacţii

Scanned with OKEN Scanner

chimice prin care molecula toxică se leagă de un atom de azot sau de oxigen al ADN-ului, se realizează noi combinaţii care modifică anumiţi nucleotizi, aşa cum s-a văzut mai sus. Or, aceştia sunt o componentă directă a genelor. Perechile de baze care creează nucleotidul sunt deranjate şi poate apărea o genă mutantă (fig. 73).

Substanţele carcinogene cu efect indirect sunt mai numeroase şi, în general, sunt legături solubile în apă, nereactive.

Ele sunt dăunătoare numai după transformarea lor în metaboliţi sau legături foarte active, ca potenţiale inductoare de cancer. Transformarea lor în metaboliţi cancerigeni are loc cu ajutorul unor enzime care se găsesc curent în corpul omului şi al animalelor.

La animale, cel mai adesea acestea ajung la ficat, adică în locul unde, în mod normal, substanţele toxice pentru organism sunt distruse, inactivate (exemplu: medicamentele, insecticidele, hidrocarburi policiclice şi unele toxine naturale). Numeroase substanţe chimice sunt puternic solubile în grăsimi şi, ca urmare, se vor găsi în permanenţă în celulele şi ţesuturile grase, în membranele lipidice şi, ca urmare, nu pot fi eliminate din organism.

Pentru a putea fi eliminate asemenea substanţe printre care se află numeroase cloroderivate (DDT, HCH, Lindan etc.), dar şi clorura de vinil sau micotoxinele, trebuie mai întâi degradate de către sistemul de dezintoxicare al corpului până la metaboliţii solubili în apă şi apoi eliminate din organism.

EMS atacă o bază nucleotidă şi anume Guanina, pe poziţia 6 a oxigenului O^6, rezultând în urma reacţiei O^6 - Etilguanină (Et - G), care, în continuare, se leagă cu Timina (o altă bază azotoasă), parteneră a Guaninei în nucleotizi.

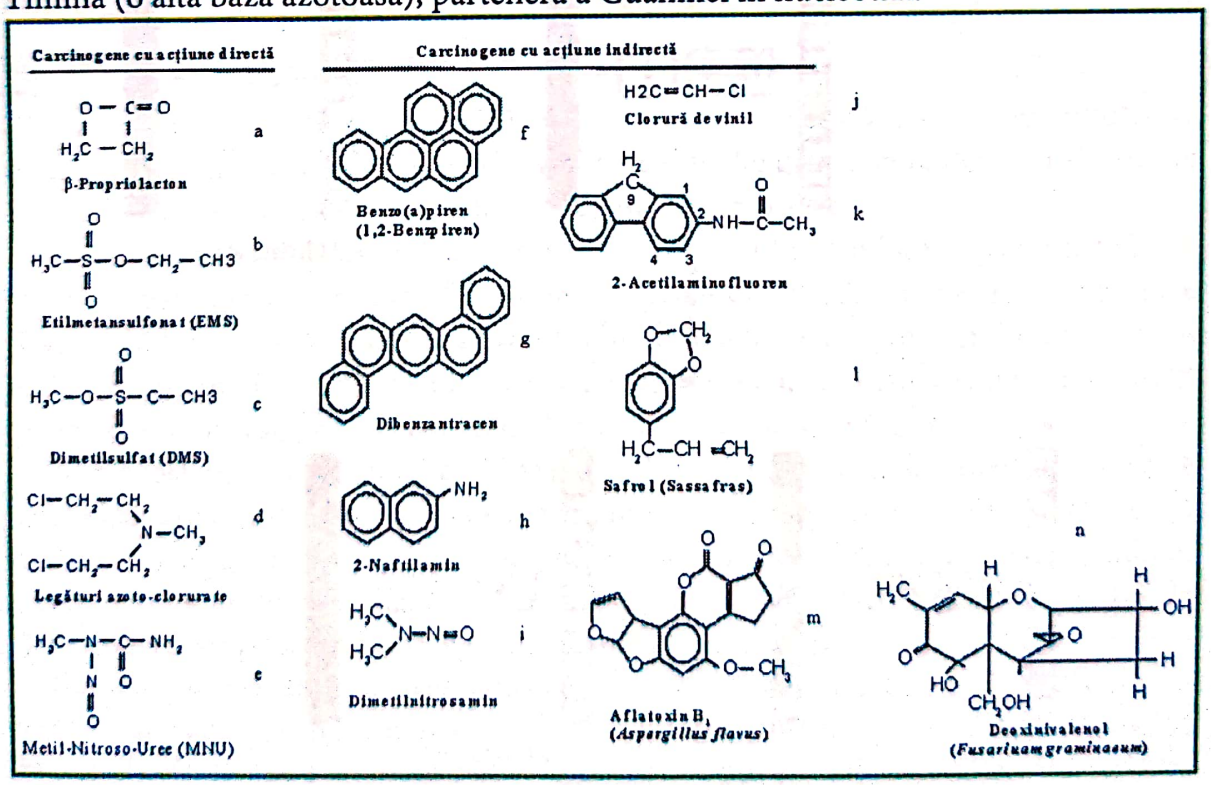


Fig. 72 – Formulele structurate ale câtorva substanţe carcinogene
a. Substanţe carcinogene cu acţiune directă
b. Substanţe carcinogene cu acţiune indirectă (*completată pornind de la Lodish şi colab., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

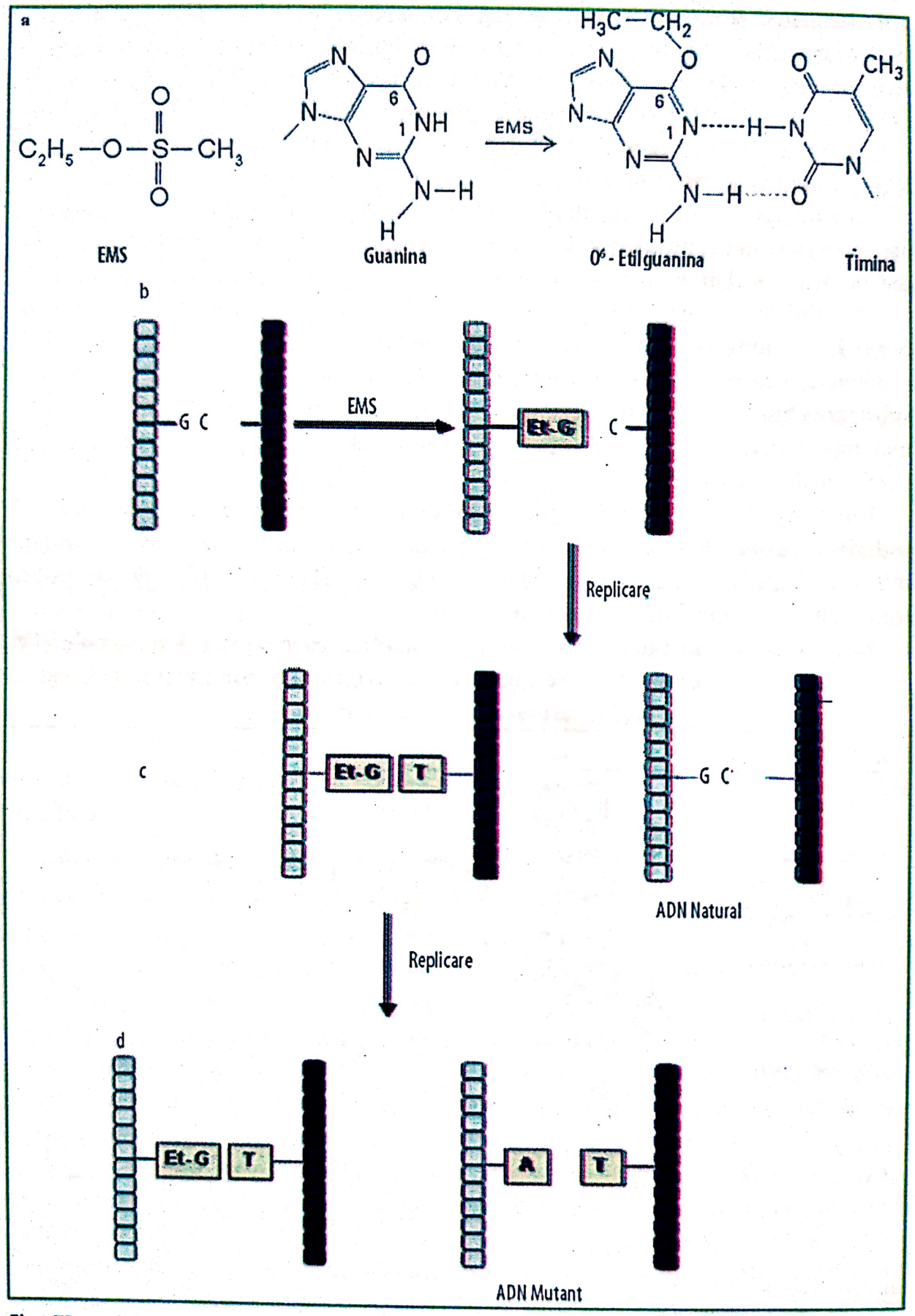


Fig. 73 – Inducerea mutațiilor de către unele substanțe chimice.
Inducerea punctuală a mutațiilor prin folosirea frecventă a unui agent chimic mutagen, în acest caz etilen metil-sulfonat (EMS)-poziția b a figurii

Scanned with OKEN Scanner

După două replicări ale ADN-ului rezultă o bandă în dublu helix (dublu elicoidal) care conţin „Et - G" în loc de „G" adică un ADN mutant.

În felul acesta perechea G/C a fost înlocuită cu perechea A/T, care poate bloca producerea în continuare a ADN-ului normal, poate determina producerea ADN-ului mutant şi declanşarea sigură a cancerului, dacă nu ar exista şi un sistem enzimatic reparatoriu, care să înlocuiască grupa „Et" din „G".

Acesta din urmă este valabil numai dacă presiunea EMS asupra organismului este de scurtă durată. Sistemul enzimatic reparatoriu nu mai acţionează dacă presiunea toxică este permanentă şi intensă.

În general, la presiuni reduse ale substanţelor carcinogene dezintoxicarea începe printr-o serie de oxidări repetate şi eficiente, care sunt catalizate de Citocrom P_{450} (o grupare de proteine). Aceste enzime sunt legate de membranele aromatice policiclice ale hidrocarburilor care sunt foarte puţin reactive. Prin oxidarea sub presiunea toxinei a unor asemenea hidrocarburi se ajunge la Epoxidin, un intermediar, care aparţine unei grupe extrem de electrofilă şi reactivă, adică foarte mutagenă.

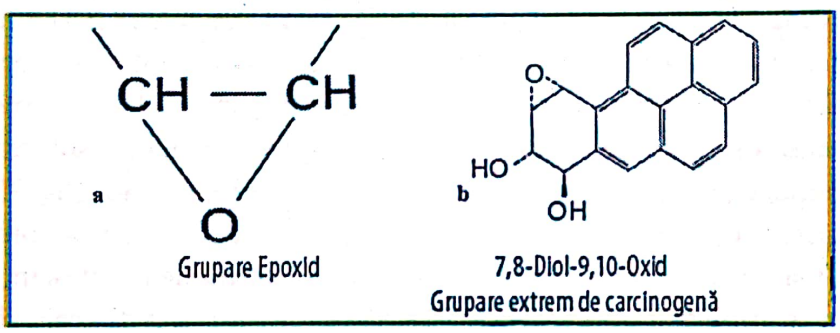


Fig. 74 – Grupări chimice extrem de cancerigene

Dacă, repetăm, presiunea toxică este eliminată în scurtă vreme, epoxidul este oxidat în continuare şi legat de acidul glucuric sau alte grupe, care devin suficient de solubile în apă pentru a fi eliminate prin urină din organism.

Se poate întâmpla însă că faza intermediară Epoxid să fie foarte greu hidrolizată într-o grupare hidroxi (probabil datorită lipsei la locul de reacţie a enzimei necesare (Epoxid-hidrază). Datorită unei atare situaţii, de exemplu, gruparea indirect carcinogenă, Benzopiren (fig. 74), derulează două reacţii Epoxi, cu formarea unui metabolit electrofil, foarte reactiv şi carcinogen, denumit 7,8-Diol-9,10-Oxid.

Alte substabţe cu acţiune carcinogenă indirectă pot fi activate prin diferite alte reacţii oxidative, inclusiv prin folosirea enzimei P450. Majoritatea fusariumtoxinelor şi a altor micotoxine se pare că urmează această cale. Or, numărul acestora, numai al celor cunoscute, este de circa 400 molecule. **Efectul de inducere a cancerului de către diferite substanţe chimice se corelează cu mutagenitatea.**

S-a demonstrat deja că toate substanţele chimice carcinogene acţionează mutagenic. Mutagenitatea celor mai multe dintre ele, identificate ca fiind carcinogene în cercetările efectuate pe animale, pot fi demonstrate pur şi simplu în testele bacteriene. Deoarece mutageneza se corelează cu potenţialul carcinogenic al unei substanţe, au putut fi dezvoltate teste de rutină privind acest potenţial, făcându-se studii de mutage-

Scanned with OKEN Scanner

neză la bacterii. Primul şi cel mai frecvent test utilizat este **testul Ames**, cunoscut fiind după numele inventatorului său, geneticianul în domeniul bacteriilor Bruce Ames.

Există mai multe versiuni ale testului. Una dintre ele presupune iniţial incubarea unei chimicale cu un extract de ficat, pentru diferite culturi bacteriene cu ajutorul cărora pot fi recunoscute anumite mutaţii speciale. Un rezultat pozitiv al testului Ames arată întru totul că legăturile chimice în discuţie (vezi fig. 74) au un potenţial carcinogen. Testul însă nu poate spune cât de puternic este acest potenţial. Pericolul real al unor legături chimice poate fi demonstrat numai în experimentele pe animale. Dar şi în acest caz nu pot fi obţinute rezultate finale (definitive) privind acţiunea carcinogenă asupra oamenilor.

A devenit foarte clar, în urma ultimelor cercetări, că efectul carcinogen acţionează mutagen şi oferă observaţii, că ADN-ul celular este modificat datorită acţiunii carcinogene a anumitor molecule. În culturi de celule s-a stabilit că celulele cancerigene cresc foarte repede şi pot să suporte modificări pe termen scurt.

Aceste rezultate importante au fost obţinute cu ADN-ul natural, dar care au fost extrase din celule umane, tratate contra cancerului, sau din celule tumorale ale intestinului gros. ADN-ul extras a fost administrat apoi unor culturi de celule de tip 3T3-fibrolitice la şoareci. Acestea, în mod normal, formează în culturi un singur strat, după care se opresc din creştere dacă vin în contact cu alte celule. O mică parte din celulele 3T3 tratate recepţionează ADN-ul şi foarte repede se observă că în anumite locuri, în vasul Petri, încep să prolifereze mai repede şi să crească una peste alta, într-un complet haos (fig. 75).

În ADN-ul prezent şi extras dintr-un carcinom al vezicii biliare a unui om sunt obligate să se înmulţească câteva milioane de celule într-o cultură de la şobolan, 3T3 fibroblastice. Acestea se înmulţesc anormal şi formează ca ţintă un clon din celulele transformate (fig. 75). Şi, pentru ca această transformare să aibă loc, adică să apară oncogena, se utilizează posibilitatea existentă la majoritatea oamenilor, ca în vecinătatea genei să se afle şi o Alu-secvenţă, cu caracter repetitiv. Prin transformări repetate se obţine din celulele şoarecelui bacteriofagul „η" clonat. Numai asemenea fagi se încrucişează (hibridează) cu o Alu-sondă, care conţine ADN-ul uman. Fagii obţinuţi prin hibridare, fie în parte, fie în totalitate, conţin oncogenele obţinute prin transformare.

Dacă celulele sunt lăsate a se modifica numai de către câţiva fagi, ADN-ul, oncogenele vor fi clonate în întregime. Dacă secvenţa ADN clonată se află numai în anumite celule transformate de către ADN-ul obţinut ca atare, atunci au fost clonate numai o parte din oncogene.

Analiza ADN-ului unor asemenea oncogene transformate în 3T3 arată că o parte din ADN-ul uman a fost preluat, acela care conţine o celulă normală, cu o genă mutantă. O genă normală este denumită **protooncogenă** şi este prezentă în permanenţă şi este foarte importantă în cazul creşterii şi înmulţirii normale a celulelor. Expresia genelor umane mutante conduce la o proliferare anormală a celulelor 3T3. Formele mutante ale prooncogenelor care provoacă o proliferare anormală a celulelor sunt denumite oncogene. Ele pot fi transferate şi altor celule şi apar în anumite retrovirusuri, care provoacă declanşarea cancerului. Cu ajutorul unor asemenea cercetări s-a ajuns la o mutaţie în ras^D - protooncogene, ca factori importanţi ai diviziunii la apariţia cancerului intestinului gros. ■

Scanned with OKEN Scanner

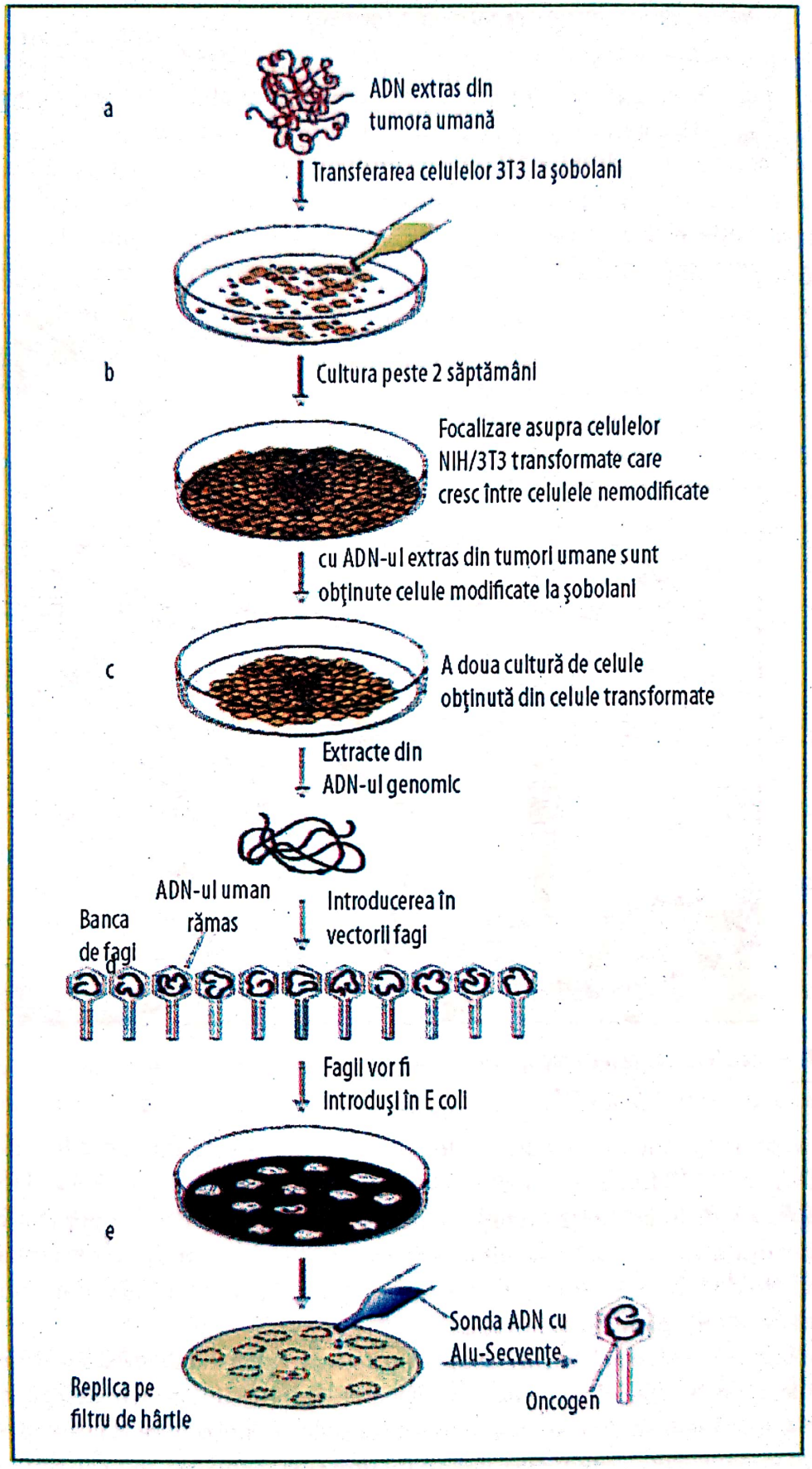


Fig. 75 – Identificarea şi clonarea oncogenelor ras (*după Lodish şi colab., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

2.6.5.3. Reziduurile industriale creează mutanți genetici

Christophe Sommer și colegii săi de la Universitatea din Otawa, intrigați de mortalitatea mai mare ca și de malformațiile abundente întâlnite la puii „Groenlandezi argintii" (fig. 84), pasăre care trăiește în zona lacurilor canadiene, și-au propus să studieze efectul unor chimicale frecvent întâlnite în aerul zonei asupra animalelor. În acest sens, ei și-au propus să cuantifice în experiențe pe șoareci riscul indus prin respirația produselor organoclorurate și a compușilor aromatici policiclici.

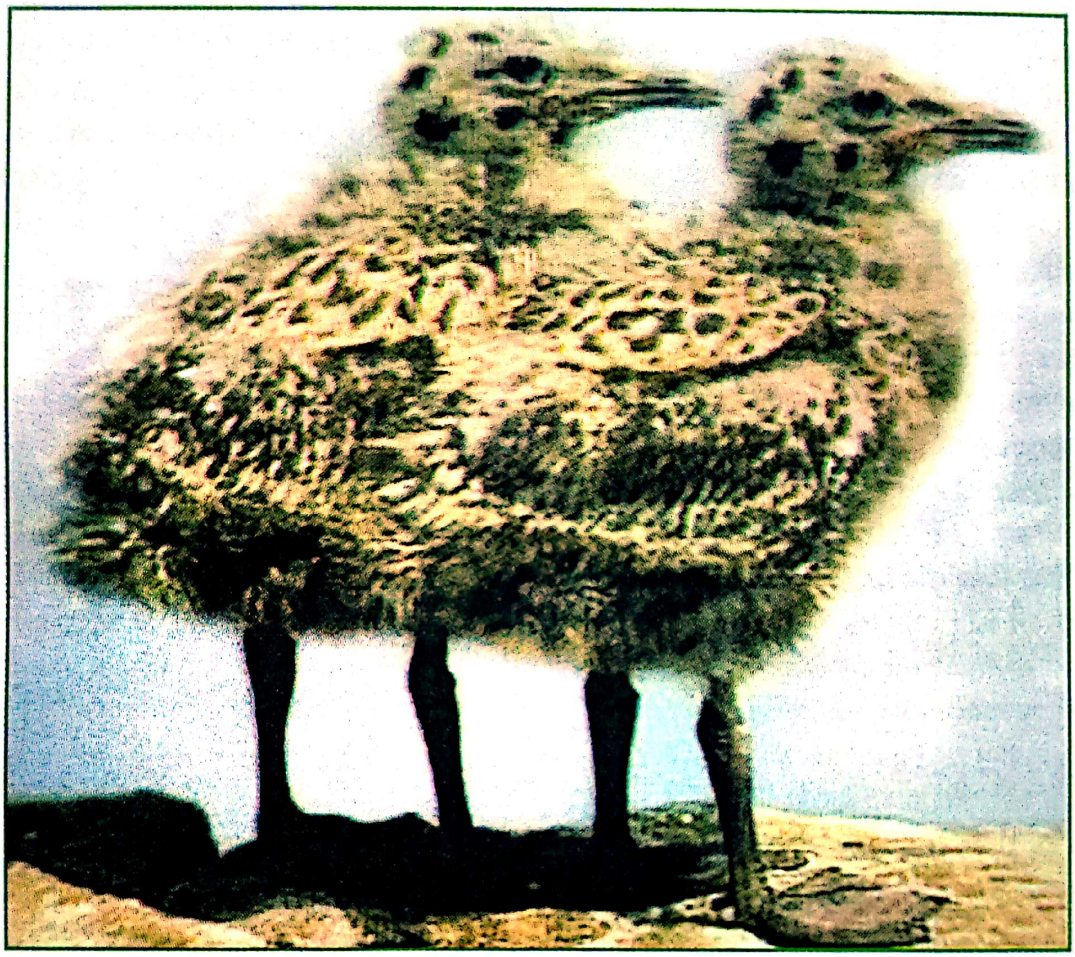


Fig. 76 – Pui afectați de poluare cauzatoare de mutații (*Science et Vie nr. 2, 2003*)

În acest scop, două populații a câte 20 șoareci fiecare au fost puse în situația de a trăi două luni la 30 km de o uzină poluantă. Analiza genetică a șoarecilor descendenți din cuplu a scos în evidență mutații de două ori mai numeroase în populațiile urmașilor părinților expuși. Acest rezultat confirmă contestările programului francez „Primequal-Predit" în ceea ce privește impactul asupra sănătății populațiilor și a mediului la nivel local, începând cu anul 1995.

Substanțele toxice acționează asupra proteinelor care catalizează reacțiile chimice în celule, ca și asupra acizilor nucleici care reprezintă sediul informației genetice. Așa cum s-a arătat mai sus, faptul că atacul substanțelor chimice creează mutații ereditare conduc la concluzia că muncitorii care lucrează în asemenea uzine își preiau riscul foarte mare de a transmite copiilor lor grave afecțiuni. Aceste informații au fost pre-

Scanned with OKEN Scanner

luate din revista „Science et Vie", februarie 2003. Într-un alt material vom explica fenomenul biomolecular prin care se induc mutațiile respective.

Cunoscându-se fenomenele genetice ale producerii cancerului s-ar putea ajunge și la soluții reparatorii ale ADN-ului defect. El poate fi reparat. Până atunci alimentele și aerul ar trebui ferite de aceste substanțe foarte dăunătoare.

* *
*

Afirmam de-a lungul acestui capitol că mutațiile sunt bune sau rele, utile sau, dimpotrivă, dăunătoare. Prin tehnicile de azi, puse la punct în mari laboratoare de biologie celulară și moleculară, există posibilitatea să se izoleze și analizeze mutantele. Aceasta deoarece de la cele mai mici eucariote - protozoarele și până la cele mai evoluate - omul, s-au identificat extrem de numeroase tipuri de mutații. Atât cele rele cât și cele benefice trebuie identificate, primele pentru a găsi măsuri de blocare a manifestărilor, iar cele din categoria a doua, pentru a putea fi folosite în tehnologii genetice. Aceste metode speciale de identificare pot fi găsite în laboratoarele speciale de tehnici biomoleculare sau în diferite materiale de strictă specialitate. Ele nu vor fi deci prezentate în acest material. ■

2.7. RELAȚIA DINTRE GENE ȘI PROTEINE

Ar fi greșit să credem că în zigotul uman s-ar găsi un plan de „construcție" a unui om. Natura nu lucrează atât de dezordonat. În zigot se găsește numai conținutul informațional exprimat în materialul genetic care coordonează dezvoltarea unui om. Nu e vorba aici de dezvoltarea unui om oarecare, ci a unui individ cu o combinație specifică de caractere ce se moștenesc. Fenotipul fiecăruia dintre oameni este rezultatul unei acțiuni comune a genotipului cu diferiți factori de mediu în care acesta există și se dezvoltă. Conținutul informațional al ADN-ului care alcătuiește materialul genetic s-a înmagazinat în ordonarea specifică a bazelor azotate pe coloanele de ADN. Această realitate ridică însă câteva întrebări, și anume:

1) În ce relații se află informațiile înmagazinate cu caracterele fenotipice ale oamenilor implicați, adică, cu alte cuvinte, ce anume fac genele despre care am vorbit atâta?
2) Cum poate fi transformată informația genetică, sau cum determină ea configurarea unui caracter sau a mai multor caractere. Cu alte cuvinte, cum apare părul negru, ochii căprui sau grupa de sânge A?

La aceste întrebări, care constituie unul din marile secrete ale vieții, ale modificării ei în sensul dorit de om, lucrează acum numeroși cercetători, iar rezultatele acestora vor fi utilizate dacă acest lucru va fi acceptat moral de către societatea umană. Așa cum se va vedea, ADN-ul care asigură moștenirea unui organism determină și evidențierea anumitor caractere, cu care ocazie transmit celulelor indicația de a sintetiza anumite proteine. ADN-ul nu reprezintă deloc planul de construcție a unei ființe vii, deși acest lucru este afirmat foarte frecvent, ci mai de grabă planul de construcție al propriilor sale elemente constructive, cum ar fi structura proteinelor și a principalului

Scanned with OKEN Scanner

constructor, enzimele. Proteinele reprezintă deci materialul de legătură dintre genotip şi fenotip. De aceea, modul cum se transmit informaţiile de la gene la proteine este foarte important.

Fără a intra în detalii, ne permitem să enunţăm câteva reguli, demonstrate deja ştiinţific:

1) Există deja dovezi certe cum că formarea şi funcţionarea proteinelor este codată în gene şi este deci coordonată de acestea. Dovezile au fost livrate îndeosebi de defecţiunile, de greşelile înregistrate în schimbul de substanţe înregistrate mai ales la bolile cu transmitere genetică. Este foarte cunoscut cazul alcaptonuriei, o boală ereditară ce face ca urina umană să se coloreze în negru în prezenţa aerului din cauza lipsei unei enzime care ar fi evitat acest lucru, conform medicului englez A. Garrrod (1909) (citat de Goldberg A.L., 1995).
   Rolul genei în acest caz a fost demonstrat ştiinţiific câteva decenii mai târziu. Rolul genei constă în aceea că ea dictează celulei fabricarea unei enzime specifice.
2) În numeroase cercetări, biochimiştii au demonstrat că celulele sintetizează sau degradează cele mai multe molecule organice, pe această cale a schimbului de substanţe şi că fiecare pas al acestor procese este catalizat de către o enzimă specifică.
3) Ipoteza conform căreia o genă ar fi reprezentată de o enzimă (ipoteza o genă – o enzimă) s-a dovedit falsă, neimportantă, mai ales atunci când cercetătorii au acumulat mai multe cunoştinţe despre gene. Căci nu toate proteinele sunt enzime. Citoscheletul proteic, cheratina şi hormonul insulina reprezintă două exemple care explică cât de departe pot fi uneori proteinele de enzime.
4) Deoarece proteinele care nu sunt enzime reprezintă totuşi produse ale genelor, cercetătorii şi-au orientat gândirea spre o altă ipoteză, şi anume aceea o genă – o proteină. Numeroase proteine sunt construite din două sau mai multe lanţuri polipeptidice şi fiecare subunitate este codată de o genă.
   Hemoglobina, de exemplu, proteina care transportă oxigenul prin sângele vertebratelor este formată, de asemenea, din două feluri de polipeptide (fig. 77).

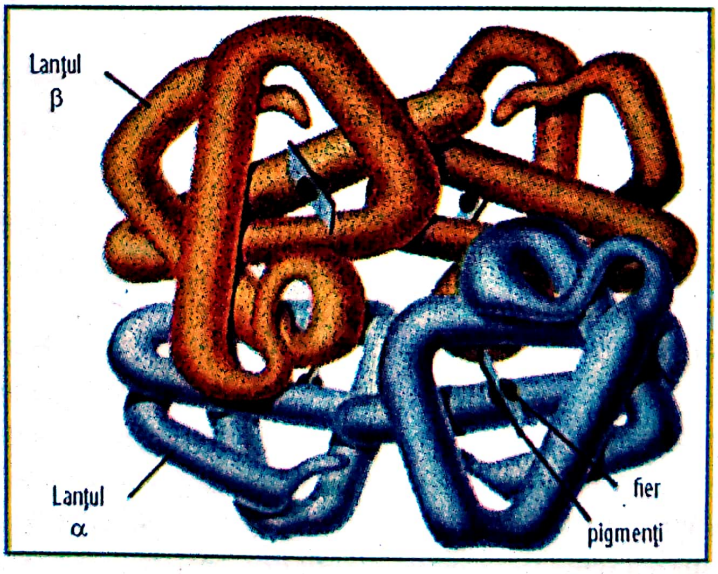


Fig. 77 – Alcătuirea bipolipeptidică a hemoglobinei
(după Lodish şi colab., 2001; Campbell şi colab., 2003)

Scanned with OKEN Scanner

Aceasta înseamnă că sinteza hemoglobinei este controlată de 2 gene, una pentru lanțul α și alta pentru lanțul β.

5) Rezultă, fără îndoială, ipoteza finală, de acum verificată și ea științific, **o genă – un polipeptid** formulată relativ recent de cercetătorii americani. Și, pentru că cele mai multe proteine sunt alcătuite dintr-un singur polipeptid, vom menține relația genă – proteină ca o corelație care va fi discutată în detaliu în continuare. ■

2.7.1. Transcripția și translația

Reprezintă pași importanți ai relației genă-proteină. A reieșit deja din cele scrise mai sus că genele dețin instrucțiunile care coordonează fabricarea specifică a proteinelor. Puntea între informația genetică și sinteza proteică este asigurată de acidul ribonucleic (ARN). Prin aceasta se răspunde, de fapt, întrebării: cum transmit genele informația către „constructorii" de proteine din celulă? ARN, ca și ADN sunt, așa cum am văzut, acizi nucleici, adică polimeri alcătuiți din nucleotide. Între cele două categorii de nucleotizi, cei ai ADN-ului și cei ai ARN-ului există două diferențe esențiale.

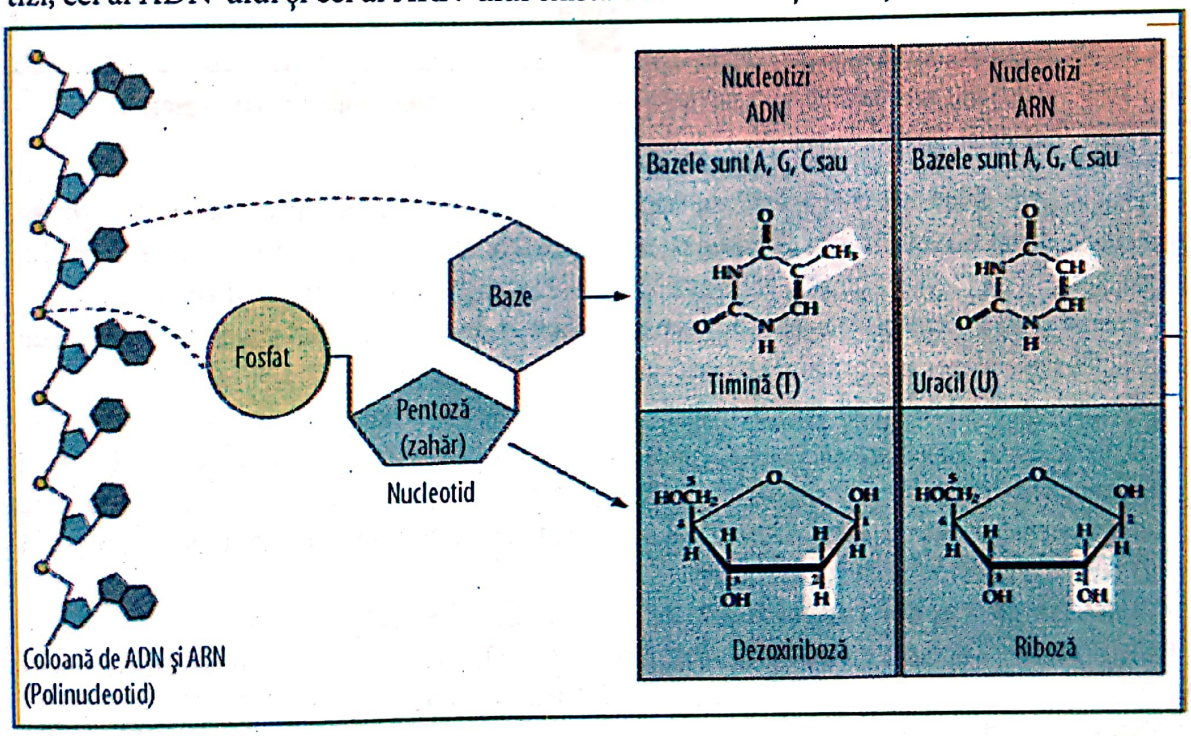


Fig. 78 – Diferențele structurale între nucleotizii ADN-ului și ARN-ului *(prelucrat după Campbell A.N., 2000)*

Numele celor două tipuri de acizi pleacă de la molecula zahăr – pentoză și care sunt dezoxiriboză în cazul ADN și riboză în cazul ARN. A doua diferență constă în faptul că a patra bază azotată este la ARN uracil în loc de timină. Ele sunt prezentate în figura 78. Este bine să le punctăm.

1) Pentoza – coloana zaharată a acidului nucleic este desoxiriboză la ADN și riboză la ARN, de unde apare și diferența de nume între cei doi acizi nucleici.

Scanned with OKEN Scanner

2) Cele patru baze azotate, coloana de baze, este alcătuită din trei baze comune (adenină, cistină, guanină) pentru ambii acizi şi o bază diferită – timina (T) la ADN şi uracilul (U) la ARN. Spaţial, construcţia celor doi acizi nucleici este asemănătoare.

Rezultă, prin combinaţia nucleotizilor şi a monomerilor patru tipuri de nucleotizi, o mare variabilitate în informaţia conţinută în gene şi care este alcătuită din sute sau mii de nucleotizi. O proteină este şi ea alcătuită din monomeri, care, la rândul lor sunt alcătuiţi din circa 20 aminoacizi diferiţi ordonaţi sub formă lineară.

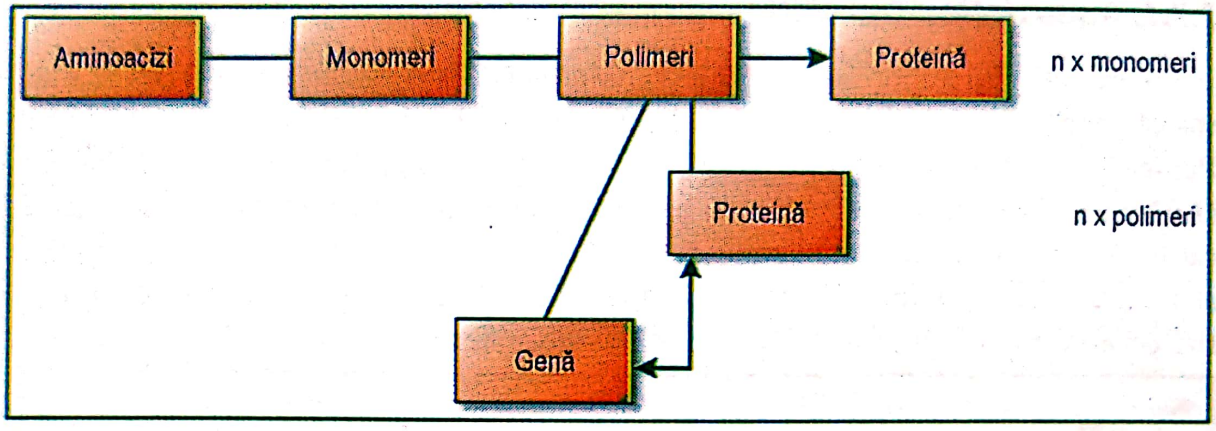


Fig. 79 – Ordonarea aminoacizilor, formarea proteinelor şi exprimarea conceptului o genă = o proteină *(M. Berca, 2004)*

Din aceste două motive acizii nucleici şi proteinele deţin informaţii care sunt scrise practic în două limbi diferite. Pentru ca o informaţie să fie tradusă dintr-o limbă în alta avem nevoie de 2 paşi (traducători) care sunt denumiţi **transcripţie şi translaţie.**

Transcripţia reprezintă acel fenomen biochimic prin care se realizează sinteza ARN-ului sub directa comandă şi coordonare a ADN-ului.

Acizii nucleici folosesc aceeaşi limbă şi de aceea informaţia poate fi uşor copiată şi transmisă de la o moleculă la alta. Există deja o singură secvenţă nucleotidică a unei gene, ce constituie baza, începutul pentru nucleotizii ARN, ce urmează a se sintetiza şi care funcţionează în mod identic cu secvenţa ADN care creează matricea necesară replicării unei coloane suplimentare.

Transcript al genei – aşa se numeşte acea moleculă de ARN care rezultă din ARN-ul sintetizat de secvenţa ADN – coordonatoare. Transcriptul conţine informaţia necesară „planului de construcţie" a proteinelor. El se marchează cu t.ARN.

Mesager ARN (mARN) este exact această moleculă primară ARN care are sarcina de a transporta (ambasadorul ADN) informaţia ADN către maşinăria de sinteză proteică a celulelor. Prin aceasta vrem să delimităm faptul că există şi molecule de ARN, care îndeplinesc alte funcţii (fig. 80).

Fluxul informaţiei genetice de la ADN la proteine se realizează prin intermediul ARN. Cei 2 paşi ai acestei formidabile performanţe genetice îl reprezintă transcripţia şi translaţia.

Translaţia reprezintă procesul de sinteză al polipeptidelor (proteine), coordonat de mARN care a transmis comenzile preluate de la ADN fabricii de producţie existentă în celulă.

Scanned with OKEN Scanner

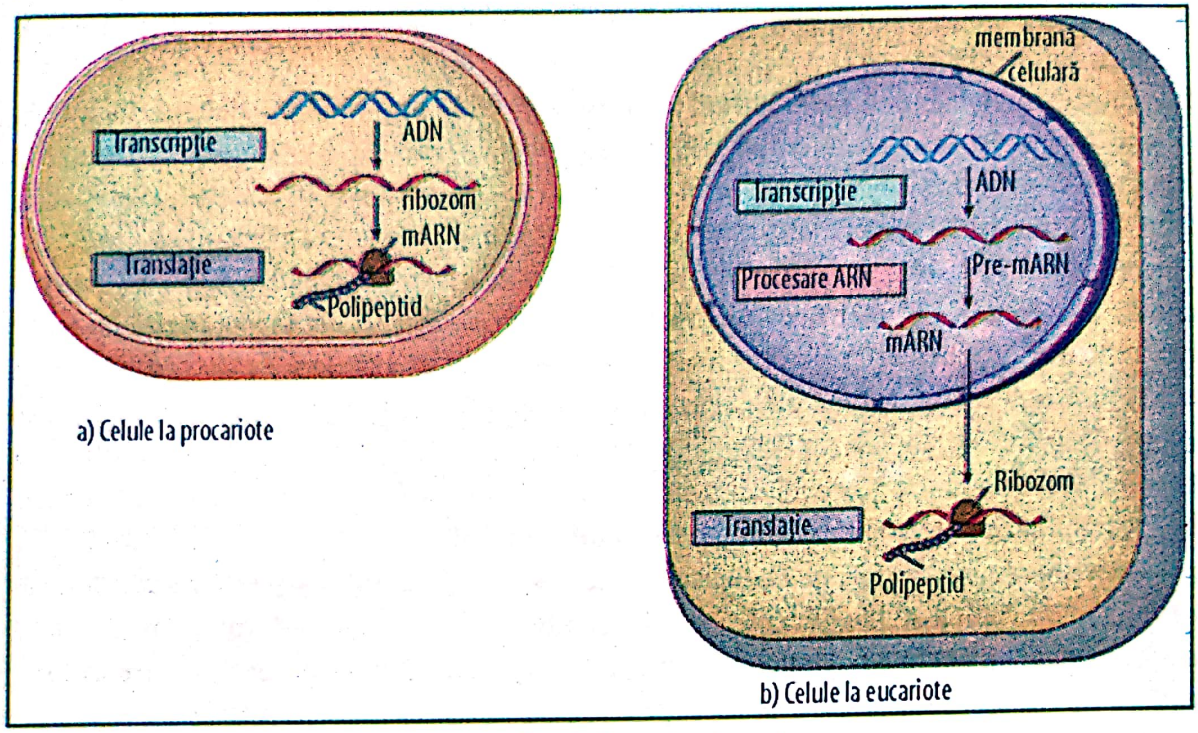


Fig. 80 – Rolul transcripției și al translației în fluxul informațional genetic (*Campbell A. Neil și colab., 2003*)

Cum se face acest lucru? Celula preia informația adusă de bazele mARN (fie și al unei singure molecule) pe care o traduce și induce în secvența aminoacizilor unui polipeptid. Locul translației (sintezei) poziționează în ribozom, despre care am vorbit în această lucrare. Aici au loc complexe legături și schimburi între numeroase proteine și mai mulți acizi nucleici pentru ca, în final, din acest amalgam de materii prime să fie fabricați acei aminoacizi care se leagă în polipeptidele dorite conținute în informația adusă de mARN. În procesul de sinteză a acestor proteine apare o diferență între pro și eucariote, deși, în ansamblu, mecanismele sunt asemănătoare. Deoarece bacteriile nu dețin un nucleu, ribozomii nu sunt separați de ADN (care normal se află în nucleu) deci nu se mai poate spune că mARN-ul iese din nucleu pentru a transmite informația ribozomilor din afara lui, adică din nucleu. Din aceste motive se poate afirma că transcripția și translația se realizează în același spațiu. La eucariote cele 2 fenomene se separă atât în spațiu cât și în timp. Transcripția se realizează în nucleu (s1) la momentul (t1) cu producerea, procesarea mARN, care apoi părăsește nucleul prin membrana lui și ajunge la ribozomi, așezați în citoplasmă unde realizează sinteza proteică. Fluxul informațional este deci:

ADN ⟶ ARN ⟶ PROTEINE

2.7.2. Codul genetic al aminoacizilor

Polipeptidele sunt alcătuite din aminoacizi, iar unele proteine au două sau mai multe lanțuri polipeptidice. În transmiterea informației și alcătuirea unui nou organism viu, lucrurile, așa cum am văzut, nu se fac deloc la întâmplare ci, dimpotrivă, totul este codat de o așa manieră încât nu se formează decât aminoacizii necesari

Scanned with OKEN Scanner

formării acestor proteine. Biologii au demonstrat ştiinţific acest lucru, dar în egală măsură au trebuit să recunoască că există numai 4 nucleotide, care ar trebui să codifice (codeze) 20 aminoacizi esenţiali şi cunoscuţi până acum. Dacă fiecare nucleotid ar codifica un singur amonoacid atunci în loc de 20, numai 4 şi-ar găsi existenţa în informaţia genetică. Secvenţa de baze AG (adenin - guanin) poate coda un aminoacid iar GT (guanină – timină) un altul. Deoarece sunt 4 baze, ar însemna că numărul maxim de aminoacizi codaţi ar fi de 16 (4^2), adică n-ar fi loc suficient pentru toţi cei 20 aminoacizi. Şi aici natura a fost formidabilă. Ea a inventat **tripleţii bazelor nucleotidice**. Tripleţii reprezintă mici **coduri – litere** (dicţionare) care pot coda toţi aminoacizii. Dacă, de exemplu, 3 baze succesive codifică acelaşi aminoacid, atunci avem 64 posibilităţi (4^3) de **litere-cod**, mai mult decât suficient pentru codificarea tuturor aminoacizilor. Cercetătorii asupra transmiterii informaţiilor pe flux de la genă la proteină au demonstrat existenţa unor **coduri triplet**.

Acest lucru înseamnă că decizia dată de informaţia genetică pentru sinteza unui polipeptid se află în ADN sub forma a 3 cuvinte-nucleotid. De exemplu, aminoacidul **serină** este codificat în ADN de tripletul AGT (adenino-guanină-timină) care, firește, este plasat la locul lui pe poziţia de exprimare a aminoacidului respectiv.

O celulă nu poate însă să traducă tripletul bazelor unei gene direct într-un aminoacid. Pentru aceasta mai este necesar un pas, care este **transcripţia** – adică trecerea informaţiei de la tripleţii aflaţi în gena (ADN) către mARN. Pentru fiecare genă însă numai una din coloanele ADN este transcrisă. Această coloană, bandă, se numeşte, aşa cum deja am explicat coloană-matrice. Ea serveşte ca bază, model, matrice pentru ordonarea bazelor azotate în ARN-ul transcris. Coloana complementară, adică cea „nematriţionabilă" deţine aceeaşi secvenţă de baze ca şi ARN-ul transcris.

Într-o moleculă de ADN, amândouă coloanele pot însă servi ca matriţe pentru fabricarea ARN-ului. O moleculă mARN devine complementară ADN-ului model dar nu identică cu acesta, deoarece bazele ARN, conform legii perechilor de baze, sunt îmbinate succesiv (fig. 81) şi dispuse alternativ, legătura dintre ele făcându-se la distanţă egală 0,34 μm.

La fiecare genă numai o coloană a dublu helixului serveşte ca matrice pentru transcripţie, adică pentru sinteza mARN. La transcripţie operează aceeaşi regulă ca la replicarea ADN, cu diferenţa că aici uracilul (U) înlocuieşte timina (T). La translaţie mARN-ul este utilizat ca un „efect", „consecinţă" pentru bazele tripleţi, adică ca un mesager format din 3 litere. Fiecare din aceşti tripleţi se numeşte **codon** şi sunt semnalaţi cu o acoladă în desen şi serveşte pentru codarea unui aminoacid. Ei sunt plasaţi exact pe poziţia lanţului polipeptidic care în mod succesiv determină sinteza acestuia. Toţi polimerii înscrişi în genă şi transcrişi prin mARN în proteine sunt cu mult mai lungi decât în acest desen.

Codonul reprezintă tripleţii de bază aşezaţi într-o anumită ordine pe coloana de mARN. Să reţinem că în coloana mARN baza „U" a înlocuit baza T corespunzătoare în ADN. În rest, ordinea bazelor este cea normală, adică bazele partenere sunt la locul lor. Pentru T baza parteneră din ADN este A. În mARN baza parteneră pentru A va fi acum „U". Tripletul AGT din ADN se va regăsi în mARN sub forma **codonului UCA**, cel care transcrie codului aminoacidului serină.

Scanned with OKEN Scanner

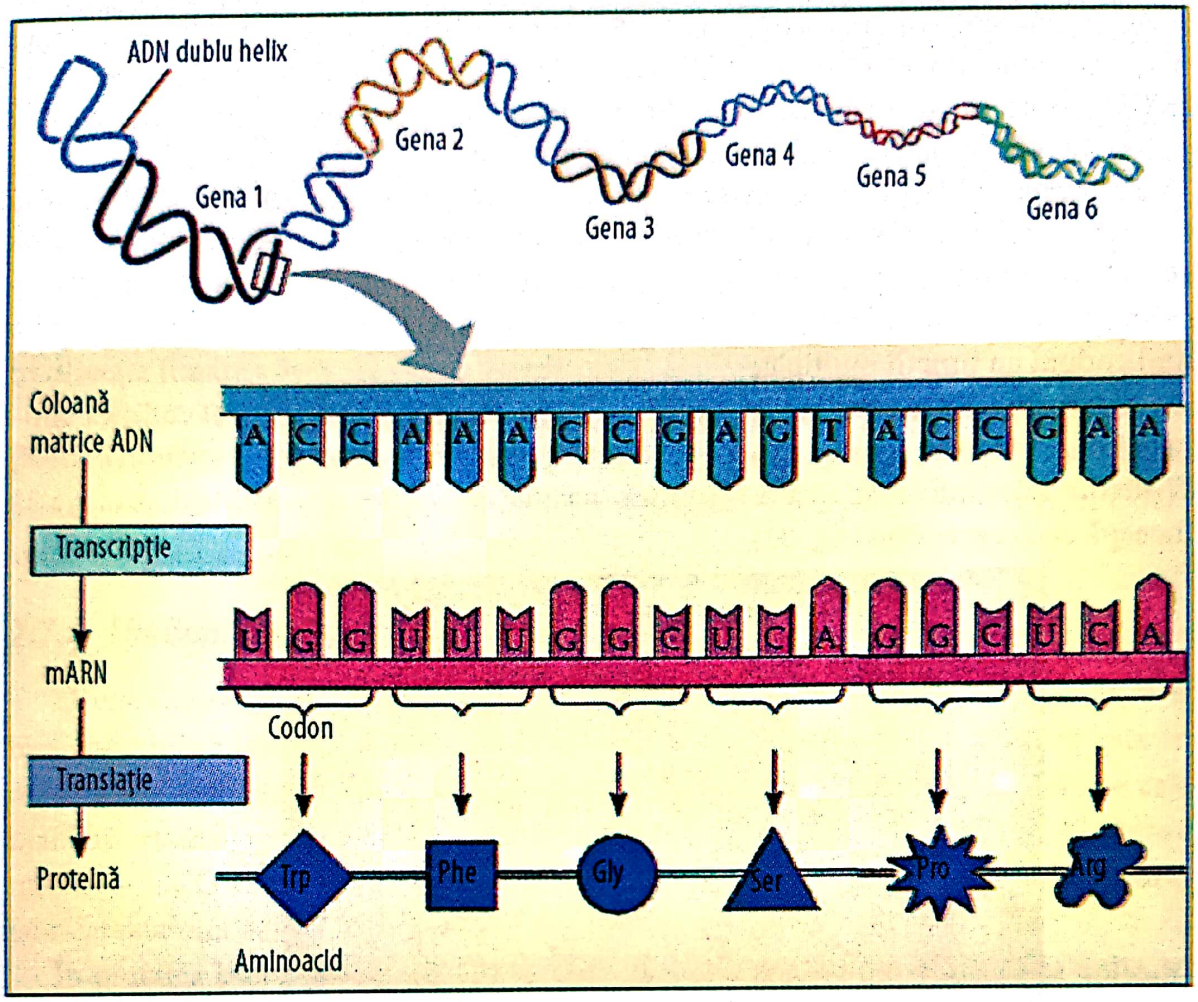


Fig. 81 – Codul triplet (*prelucrare după Campbell A.N., 2000*)

Fiecare codon prezent pe coloana mARN serveşte la „fabricarea", sintetizarea unuia din cei 20 de aminoacizi şi deplasarea, poziţionarea lui pe locul potrivit în lanţul polipeptidic. Deoarece, codonul este un triplet de baze azotate, numărul de nucleotide ale lui mARN este de trei ori mai mare decât numărul de aminoacizi ai unei proteine. Un lanţ de mARN care deţine 300 nucleotizi poate să fie codat dar de 100 aminoacizi aşezaţi însă în tripleţi. ■

2.7.3. Decodificarea genetică

În anii '60 cercetătorii în biologie moleculară, în urma unor elegante cercetări au reuşit să dezlege şi această problemă misterioasă. Primul codon a fost decodificat în anul 1961 de către americanul Marshall Nirenberg. El a reuşit să fabrice în mod sintetic un mARN şi a observat că de fiecare dată când începea translaţia cu acest ARN, aceasta începea cu acelaşi codon, deşi a repetat de 4 ori cercetarea. Acesta era „UUU" şi a fost denumit „poli(U)".

Nirenberg a introdus acest poli(U) într-un vas de reacţie cu un amestec de mai mulţi aminoacizi, precum şi cu ribozomi şi alte componente necesare pentru sinteza proteinelor. Sistemul său artificial a făcut ca poli(U) să translateze într-un polipeptid care conţinea un

Scanned with OKEN Scanner

singur aminoacid, şi anume fenilalanina (Phe) (vezi anexa 3), iar polipeptidul format din mai mulţi aminoacizi fenilalaninici a fost denumit polifenilalanină. S-a ajuns la concluzia că UUU codează numai fenilalanina. Curând după aceea, prin experienţe asemănătoare, au fost identificaţi aminoacizi codaţi de AAA, GGG şi CCC.

Folosindu-se tehnici mult mai complicate au trebuit ulterior să fie decodificaţi şi tripleţi micşti tip AUA sau CGA. Pe la mijlocul anilor '60 (mai exact în 1964 – 1966) au fost decodificaţi toţi cei 64 codoni. Aşa cum se observă din figura 82, funcţia de codificare a aminoacizilor o au însă numai 61 tripleţi. Cauza acestei situaţii este că unii codoni au funcţii multiple.

Aşa, de exemplu, codonul AUG are o funcţie dublă. Pe de o parte el codifică aminoacidul metionină (MET) dar serveşte şi drept codon starter sau „Initiation codon". El deţine acea informaţie care spune că maşina de sinteză a proteinelor trebuie să înceapă cu acest codon (fig. 82).

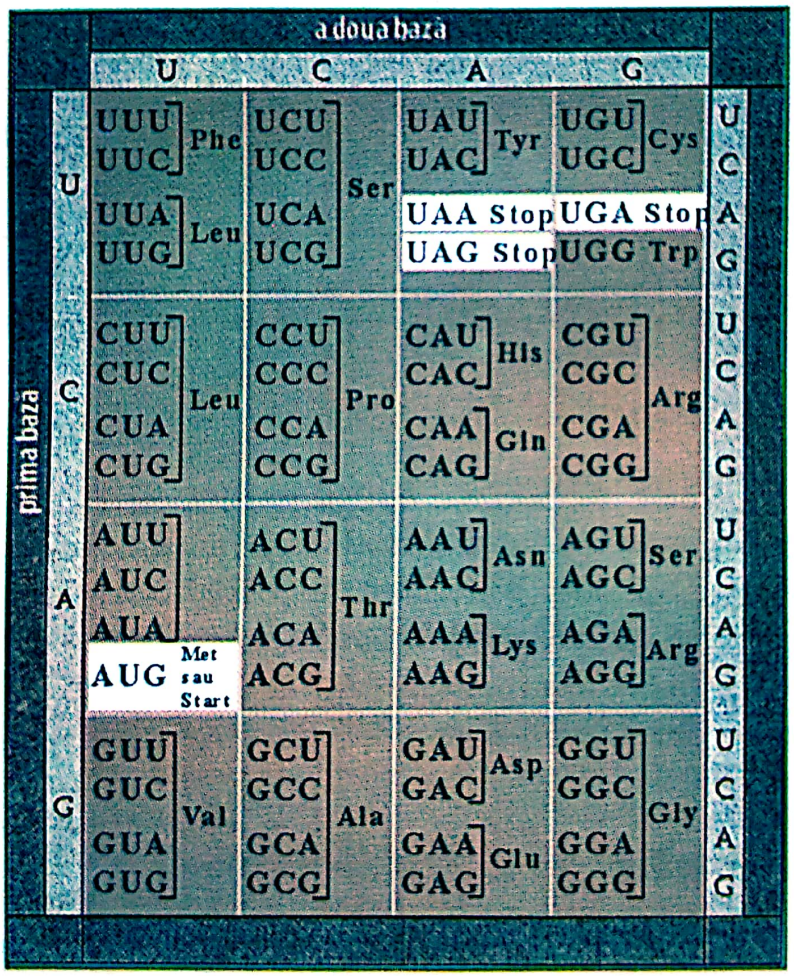


Fig. 82 – Dicţionarul codurilor genetice.
Cele trei baze ale mARN sunt prezentate de la stânga la dreapta. Numai o singură bază produce un singur aminoacid. UGG produce triptofanul, un aminoacid esenţial pentru viaţă. Ceilalţi aminoacizi sunt produşi de 2-4 tripleţi (*Campbell A. Neil, 2001, Benjamin L., 2004; Berg M.I. şi colab., 2003*)

Ceilalţi trei codoni nu mai au sarcini în producerea de aminoacizi, ci ei servesc ca codoni de stopare sau „terminationocodoni" şi semnalizează sfârşitul mesajului genetic. Codonii GAA şi GAG sunt destinaţi sintezei acidului glutaminic şi de aceea sunt consideraţi redundanzi, adică pot contribui la degenerarea codului genetic.

Scanned with OKEN Scanner

Principiul care ordonează modul de grupare al informației în vederea decodificării sau a eficienței mecanismului este denumit cadru de descifrare (citire) – reading frame – în limba engleză.

Să luăm în considerare propoziția următoare: „Ursului îi place zmeura (UPZ)". Dacă schimbăm cuvintele în propoziție și spunem: „Zmeurei îi place ursul" (ZPU) obținem cu totul altceva, altceva fără sens și fără posibilitatea de a fi adevărat. Formarea acizilor aminici, așa cum s-a văzut din figura 82, poate avea loc numai dacă translatarea are loc în ordinea transmisă de codoni mARN, de ex. UGGUUUGGCUCA, în direcția firească de la stânga la dreapta până la sfârșit.

În final trebuie să subliniem faptul că informația genetică nu se suprapune în fluxul ei pe bazele triplete sau codoni, ci că fiecare genă își trimite informația exact acolo unde este nevoie pentru producerea aminoacizilor și a proteinelor necesare dezvoltării organismului. ■

2.7.4. Limbajul informației genetice este comun

Urmare numeroaselor cercetări efectuate de către marii specialiști în genetică și biologie moleculară rezultă că așa-numitul cod genetic este universal și că este în măsură egală utilizat de ființele vii de la bacterii la om. Aceasta este una dintre cele mai importante legi ale biologiei și susține teoria evoluționistă a lui Darwin. Codonul mARN – CCG este folosit de absolut toate organismele pentru translatarea și deci fabricarea aminoacidului prolin.

În practica biotehnologiilor, universalitatea codului genetic a condus la aplicații dintre cele mai spectaculoase. Deși vom mai vorbi despre acest lucru, subliniem că insulina poate fi obținută de bacterii în folosul omului prin simpla inducere a genelor umane la bacteriile gazdă. Asemenea exemple se înmulțesc cu fiecare zi. Decodificarea codurilor genetice ale mARN-ului a beneficiat de cercetări prin anii '70 care au condus relativ rapid la decodificarea genomului uman, anunțată cu mare pompă la începutul secolului XXI, care au relansat cercetările biotehnologice în domeniul obținerii celor mai neînchipuite soluții de păstrare a sănătății omului și la dezvoltarea lui ca individ.

Există și abateri de la codul genetic universal, cum ar fi *Ciliatum paramecium* la care biologii au constatat că tripleții UAA și UAG nu sunt utilizați la semnale STOP de întrerupere a translației, ci pur și simplu ca un codon glutaminic . În ADN-ul din mitocondrii și cloroplaste cercetătorii au găsit și alte devieri de la lege.

Acest ADN extracromozomial codifică pentru o serie de proteine aparținând celor două organite. Aceste abateri de la lege, neexplicate din punct de vedere al evoluției, nu infirmă legea universalității codului genetic.

Această limbă comună pe care toate organismele vii o folosesc trebuie să fi apărut foarte aproape de momentul apariției vieții. Acest vocabular genetic comun vorbește clar despre înrudirea tuturor organismelor existente pe pământ. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.7.5. Sinteza ARN-ului

Am ezitat dacă este necesar să prezentăm acest mecanism în detaliu în această lucrare. Am pornit de la ideea că dacă nu este foarte necesar pentru înţelegerea fenomenelor biotehnologice, nici nenecesar nu poate fi, pentru că metamorfoza ADN-ului în ARN şi invers este unul din cele mai fantastice fenomene biochimice care se întâmplă în natură pe segmentul ei cel mai important, materialul genetic. Să sintetizăm puţin:

1) Mesagerul ARN (mARN) este transportorul informaţiei ADN către maşinăria de sinteză a proteinelor – ribozomul. Transcrierea se face de către matricea coloanei ADN a unei gene.
2) Muncitorul, executorul operaţiunii este enzima ARN - polimeraza. Ea îndepărtează cele două coloane, local, şi plasează nucleotizi specifici ARN-ului în mod corespunzător, adică conform regulii perechilor de baze şi în succesiunea codată.
3) Modul de lucru al polimerazei ARN este asemănător cu al polimerazei ADN, adică enzima amintită cuplează nucleotizii numai în poziţia 3′ – final a polimerului în expansiune. O moleculă ARN creşte deci de la 5′ la 3′ la fel ca la replicarea ADN-ului.
4) Începutul şi sfârşitul transcripţiei unei gene este marcat cu secvenţe specifice de nucleotizi ADN. Întreaga secvenţă ADN care este alcătuită din sute sau mii de nucleotizi inclusiv cei iniţiali şi finali şi care este transcrisă într-o moleculă de ARN, este denumită **unitate de transcripţie** (fig. 83). La eucariote fiecare unitate de transcripţie cuprinde numai o genă. mARN-ul codează numai sinteza unui singur polipeptid. La procariote o unitate de transcripţie (transcriptibilă) poate să includă mai multe gene, care codează proteine cu funcţiuni apropiate, aşa cum sunt, de exemplu, enzimele care catalizează în lanţ reacţii de biosinteză. Bacteriile deţin un anumit tip de polimerază – ARN care produc nu numai ARN, ci, deopotrivă şi alte clase de ARN, care participă la sinteza proteică.
5) Din punct de vedere al clasificării polimerazelor ARN-ului, numai la eucariote întâlnim următoarele forme:
    a) mARN specializat în sinteze proteice este catalizat de polimeraza II.
    b) Alte proteine care în unele cazuri speciale ajută polimeraza II în exercitarea funcţiei.

Dacă polimeraza ARN se mişcă de-a lungul unei gene de la zona de iniţiere către zona de finalizare, ea sintetizează molecula de ARN a cărei secvenţă de baze este determinată de matricea ADN. Aceasta se derulează pe direcţia 3′ →5′ (5). Întregul segment transcris este denumit unitate transcrisă.

Transcripţia începe în zona de iniţiere prin separarea de către polimerază a celor două coloane ADN şi prin eliberarea coloanei matriţă (5), care face posibilă recunoaşterea perechilor de baze ARN. Polimeraza ARN lucrează continuu, inclusiv asupra coloanei nematrice (de jos în sus). Coloanele ADN se îndepărtează una de alta, iar

Scanned with OKEN Scanner

mARN-ul se lungeşte pe direcţia (5′ – 3′) (5). În această „supă" creată de polimeraza ARN, cele două coloane ADN se unesc în urma ei reformând dublu helixul.

Procesul continuă prin prelungirea ARN-ului până în zona terminală. Pre-mARN-ul, transcripţia primară a unei gene este eliberat (3) şi polimeraza ARN părăseşte din nou ADN-ul. Dacă se scrie secvenţa nucleotizilor unei gene, întotdeauna va fi prezentă şi coloana nematrice, deoarece aceasta deţine aceeaşi secvenţă a ARN-ului transcris (de aceea în regiunea iniţială se află, de asemenea, „curentul invers" al zonei codate, adică 5 final al coloanei nematrice).

În nucleul unei celule umane se află circa 40.000 molecule de polimerază II ARN. ■

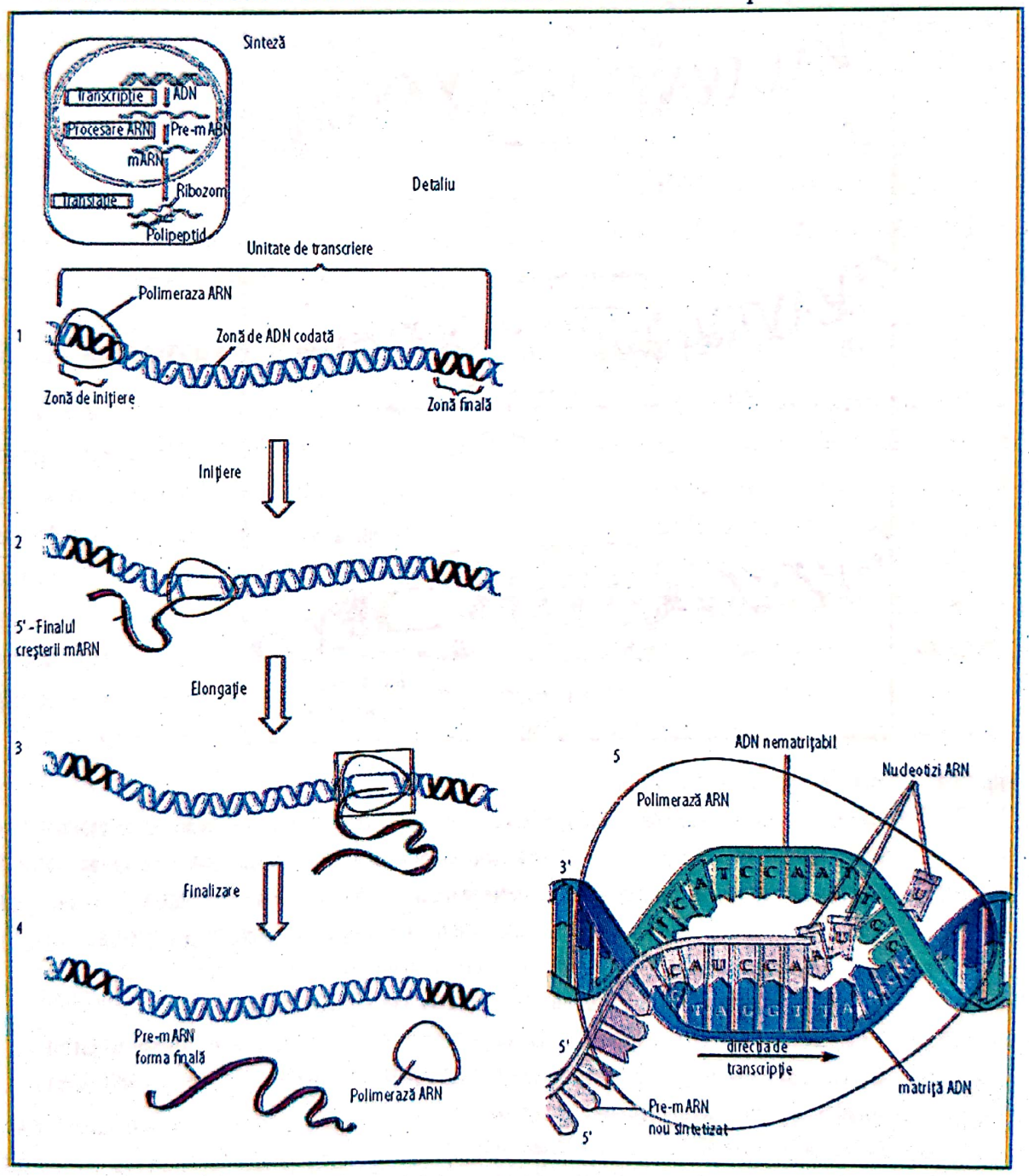


Fig. 83 – Detalii privind transcripţia (*după Campbell A. Neil, 2000, prelucrare*)

Scanned with OKEN Scanner

2.7.6. Inițierea transcripției

Polimerazele ARN se leagă de acea zonă a ADN-ului denumită **promotor**. Un promotor este alcătuit din următoarele:

- o zonă de inițiere în care de fapt începe sinteza ARN-ului;

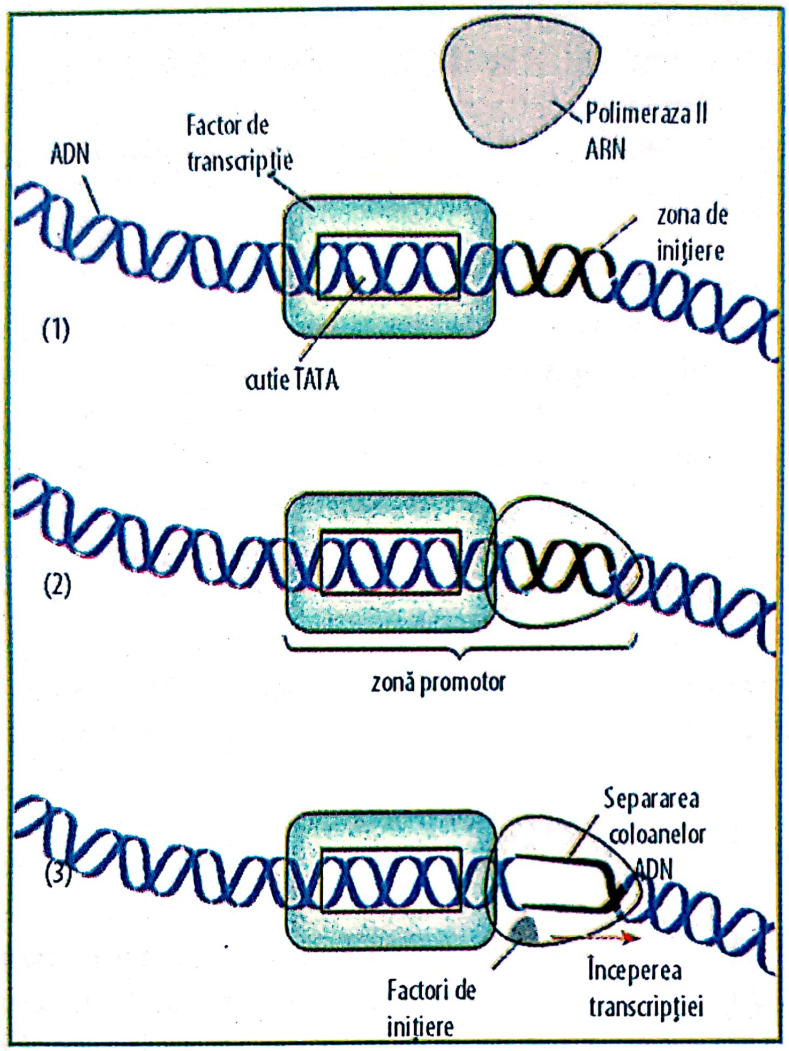


Fig. 84 – Promotorii și inițierea transcripției.
Polimeraza ARN se fixează pe o zonă specială de ADN denumită promotor. La eucariote, promotorii se întind pe o zonă formată din cca 100 nucleotizi lungime. Aceasta constă dintr-un segment de inițiere și câteva segmente ADN, legat cu proteine și care ajută la inițierea transcripției.
Polimeraza II ARN, de exemplu, enzima care sintetizează ARN-ul la eucariote se cuplează la un promotor care conține o cutie TATA, adică un scurt segment ADN format din timină (T) și adenină (A) ca baze. Aceasta se află la 25 nucleotide distanță față de locul de inițiere.
1) O polimerază ARN nu poate singură recunoaște promotorul. Ca urmare, o altă proteină, un factor de transcripție, recunoaște cutia TATA și se cuplează de ADN încă înaintea polimerazei ARN. Acest complex este acum recunoscut de polimerază;
2) Dacă polimeraza ARN se cuplează zonei, atunci
3) Promotorii se asociază cu alți factori de transcripție înainte de începerea sintezei ARN (*Tijar R., 1995; Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

- câteva duzini de nucleotizi pe direcția jos – sus (de jos în sus) (în direcția de la 5' final a ADN-ului nematriceal (upstream în engleză). Pentru ca polimeraza ARN să recunoască promotorul trebuie ca acesta să dețină anumite motive. Polimeraza II ARN la eucariote recunoaște în felul acesta o zonă promotorie denumită cutie TATA (fig. 84). Numele TATA provine de la o secvență de baze care conțin multă timină (T) și adenină (A). Cutiile TATA se află la circa 25 de nucleotide distanță spre stânga față de zona de inițiere (de jos în sus).

Polimeraza II singură nu poate să recunoască și nici să se cupleze la promotor. Pentru aceasta are nevoie de alte proteine incluse în denumirea de **factori de transcripție**. Aceștia ajută polimeraza ARN în a căuta zona promotorie pe molecula de ADN. Un tip de factori de transcripție reprezintă proteinele care se cuplează la promotor înainte ca polimeraza ARN să se poată alipi acolo. În final, polimeraza II ARN recunoaște complexul proteine + ADN pe locul de cuplare. De îndată ce polimeraza ARN s-a legat la promotor, începe separarea coloanelor ADN ale dublu helixului în zona de inițiere și totodată se declanșează transcripția.

2.7.7. Alungirea coloanei ARN și finalizarea transcripției

Odată început procesul de transcripție, polimeraza II ARN se deplasează de-a lungul spiralei ADN pe care o despiralează din dublu helix, separă cele două coloane și disponibilizează circa 10 baze pentru împerecherea cu nucleotizii ARN (vezi figura 83). Enzima se depune pe 3′ – final a nucleotizilor moleculei ARN în creștere, deplasându-se de-a lungul dublu helixului. În soluția rezultată din derularea sintezei ARN, se separă însăși molecula ARN care se îndepărtează de matricea ADN. Molecula recent sintetizată are o viață foarte scurtă. Viața scurtă a ARN-ului arată că transcripția se derulează cu o viteză medie de 60 nucleotide/secundă.

Aceeași genă poate fi transcrisă simultan de mai multe molecule de polimerază ARN, procesul fiind asemănător cu un convoi de camioane care aleargă de-a lungul „autostrăzii" – ADN. Acțiunea comună a numeroaselor puncte de polimerază în transcrierea simultană a unei gene mărește în același timp numărul zonelor în care se formează mARN (molecule) și creează pentru celule un mare potențial de a fabrica foarte rapid proteinele necesare.

Finalizarea transcripției

Transcripția durează numai atâta vreme cât polimeraza ARN a ajuns la zona finală a ADN. Cercetarea a descoperit deja că există anumite secvențe de baze azotoase, care transmit polimerazei ARN semnalul privind stoparea depunerii de nucleotizi pe lanțul de creștere a ARN-ului în vederea opririi creării de noi molecule de ARN. La eucariote, acest semnal de stopare a transcripției este dat de secvența de nucleotizi AATAAA. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.7.8. Câteva detalii privind translația

Am arătat deja că translația reprezintă un comportament genetic prin care celulele traduc informația codată și în baza ei se lansează comanda de fabricare a proteinelor. Informația genetică este transportată de un „ambasador" alcătuit dintr-o succesiune de codoni având drept conținut biochimic mARN-ul.

Pentru o bună funcționare a translației, devine necesar un adaptor care este plasat între codonul ARN și aminoacid și care este un nou sortiment de ARN, denumit transfer ARN (tARN). Funcția principală a tARN este aceea de a selecta și transporta aminoacizii necesari din rezervorul citoplasmatic către ribozom. Fiecare celulă deține în citoplasma ei o rezervă a tuturor celor 20 de aminoacizi, care provin fie din sinteze pregătitoare sau din mediul din jurul ribozomului, în situații de sinteze abundente. În ribozom are loc o cuplare a aminoacizilor selectați, care se potrivesc locului pe lanțul peptidic care se fabrică (fig. 85).

Moleculele de tARN nu sunt egale. Cheia succesului translației constă în faptul că fiecare tip de tARN construiește legătura între un anumit codon mARN și aminoacidul potrivit. Adică fiecare aminoacid este transportat numai de un tARN al lui, specific. De îndată ce molecula de tARN vine la ribozom, el aduce la extremitatea sa și aminoacidul. La cealaltă extremitate tARN-ul deține un triplet, care este denumit **anticodon**. Cu ajutorul acestuia, tARN-ul cuplează conform regulilor cunoscute, perechea de baze la un codon complementar mARN. Spre exemplu, codonul mARN UUU este translatat în aminoacidul fenilalanină (vezi fig. 85).

Molecula tARN-ului care este legată prin punți de hidrogen la acest codon conține AAA ca anticodon și ca aminoacid deține fenilalanină. Dacă molecula mARN-ului este trecută printr-un ribozom, fenilalanina este încorporată într-un lanț polipeptidic, dacă, bineînțeles codonul UUU este prezent în procesul de translație (fig. 85). Ambasadorul genetic este tradus codon pentru codon cu care ocazie tARN-ul livrează aminoacizi într-o ordine prescrisă, iar enzimele ribozomale îi cuplează în lanțuri polipeptidice. Molecula tARN seamănă deci cu o carte de joc care are scris pe față cuvântul „acid nucleic" (anticodon), iar pe cealaltă fațetă specificul „proteina" (aminoacizi). Translația, așa cum a fost prezentată pare aici simplă (ca principiu) însă mecanismele ei biochimice sunt extrem de complexe. ■

2.7.9. Structura și funcția tARN-ului

Formarea, sintetizarea tARN, ca și a altor tipuri de ARN urmează același model ca și în cazul mARN, adică el este sintetizat de către un modul ADN existent în nucleul celulelor eucariotelor. La rândul lui, tARN este transportat în citoplasmă ajungând la locul translației adică pe traiectul citosol-ribozom. Fiecare moleculă de tARN poate să fie folosită în mod repetat. Totul se petrece în circuit. Molecula tARN preia din citosol aminoacizi care se potrivesc structurii sale, îi transportă în ribozom, îi descarcă, îi depune acolo, după care se reîntoarce pentru a se reîncărca. Circuitul lui este deci nucleu – citoplasmă – citosol – ribozom – citosol – ribozom ...

Scanned with OKEN Scanner

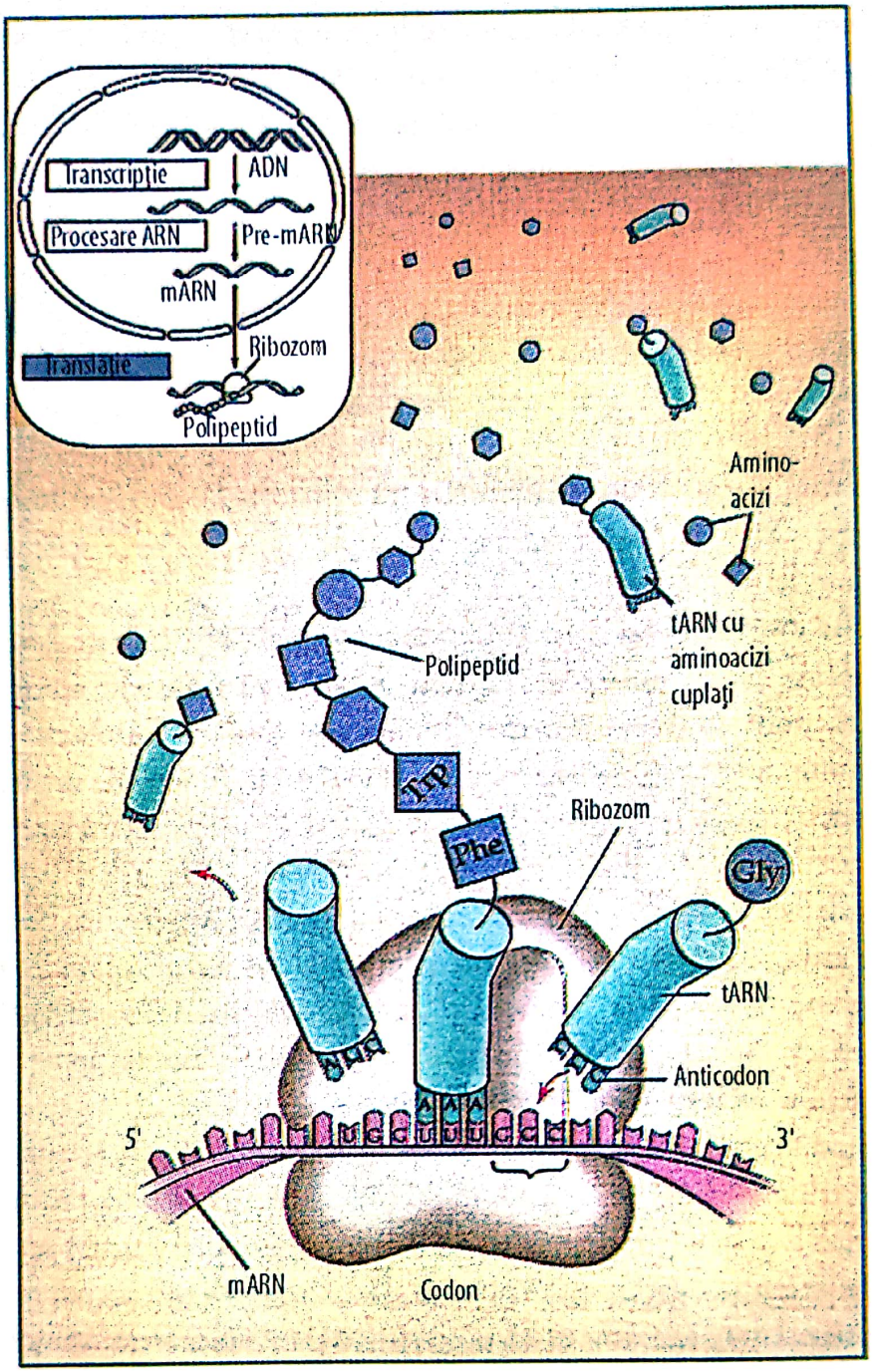


Fig. 85 – Principiul de bază al translației.
Trecerea unei molecule mARN prin ribozom traduce condonul în aminoacid. Este ca și când o cartelă magnetică ar fi citită de un decodor. Adaptorii sunt molecule de tARN, fiecare deținând un anticondon specific pe o terminație și un anumit aminoacid pe o altă terminație. Lanțul polipeptidic în creștere este alungit cu un aminoacid numai dacă un tARN încărcat cu anticondonul lui este legat la codonul complementar mARN.
tARN încărcat cu aminoacizi nu este transportat direct în ribozom, ci el este dispersat în numeroase copii în citoplasmă de jur împrejurul ribozomului. O întâlnire întâmplătoare cu un codon real care se află pe ribozom determină cuplarea aminoacidului (*Gross M., 1996; Campbell A.N., 2000, prelucrare*)

Scanned with OKEN Scanner

Aşadar, funcţia de bază a tARN este aceea de **transportor** al unor aminoacizi specifici (şi nu a oricăruia din cei 20) (anexele 3 şi 4). Pentru aceasta, molecula de tARN deţine o structură nemodificabilă. Atenţie! Dacă această condiţie nu este îndeplinită, funcţiile celulelor şi sănătatea organismului pot fi grav afectate (fig. 86). O moleculă tARN este formată dintr-o coloană conţinând pe lungime circa 80 nucleotide. Se observă că această coloană este foarte scurtă comparativ cu sutele de nucleotide care formează molecula de mARN. Coloana de ARN este formal o structură secundară bidimensională, iar aceasta este pliată într-o structură terţială, tridimensională.

Modul de pliare este determinat de interacţiunea diferitelor domenii ale lanţului de nucleotizi.

În anumite zone ale moleculei tARN, sfârşitul (finalul) coloanei este lung şi închis (blocat) şi formează un L, poartă anticodonul unui triplet de baze speciale care se fixează pe codonul mARN specific.

Pe terminalul de vizavi mai scurt al L-ului, molecula de tARN este deschisă (5′). Dacă pentru fiecare codon mARN ar fi specific numai un aminoacid, adică o singură moleculă tARN, atunci ar trebui să existe 61 molecule tARN diferite (vezi fig.a 82).

În realitate, numărul acestora este mai mic şi variază în funcţie de organism între 31 şi 45. Această cifră este reală pentru simplul motiv că unele anticodoane ale moleculelor tARN recunosc cât 2 sau 3 codoane din mARN.

Această „independenţă" este la rândul ei posibilă, deoarece perechea de baze între cele 3 baze ale unui codon şi corespondentele (prima) bază a anticodonului tARN nu urmează într-o ordine exactă ca în perechile ADN - ADN sau ADN –mARN.

Această idee privind „clătinarea" perechii de baze a fost denumită „ipoteza wobble" (de la englezescul wobble, pentru a se clătina, a ezita).

Cele mai modificabile (clătinabile) molecule tARN conţin Inosin (I), un nucleotid modificat în poziţia „wobble" a anticodonului său. Inosin-ul rezultă printr-o modificare enzimatică a unei adenosine (deşi acest lucru chimic reprezintă un guanosin desaminizat de pe lanţul deschis a tARN-ului). Dacă anticodonul şi codonul se purifică, baza Inosin permite să formeze punţi de hidrogen cu fiecare dintre cele 3 baze, U, C sau A.

Din aceste considerente, o moleculă tARN care conţine un anticodon ECI se poate lega la codonii GGU, GGC şi GGA, toate trei fiind compatibile cu aminoacidul glycină. Ipoteza wobble explică de ce codonii sinonimi pentru un anumit aminoacid, cu aceeaşi bază în poziţia 3, dar cu diferenţieri ale celorlalte 2 baze, au nevoie de unul şi acelaşi tARN.

Aşa se explică de ce apar organisme cu minimum 31 variante diferite tARN. Wobble (clătinarea) la nivelul tARN este posibilă prin redundanţa codului genetic. Altminteri regulile acestuia rămân de neatins: sinteza unui polipeptid are loc exclusiv specific şi nu oscilatoriu, îndoielnic (vezi anexele 8,9). ■

Scanned with OKEN Scanner

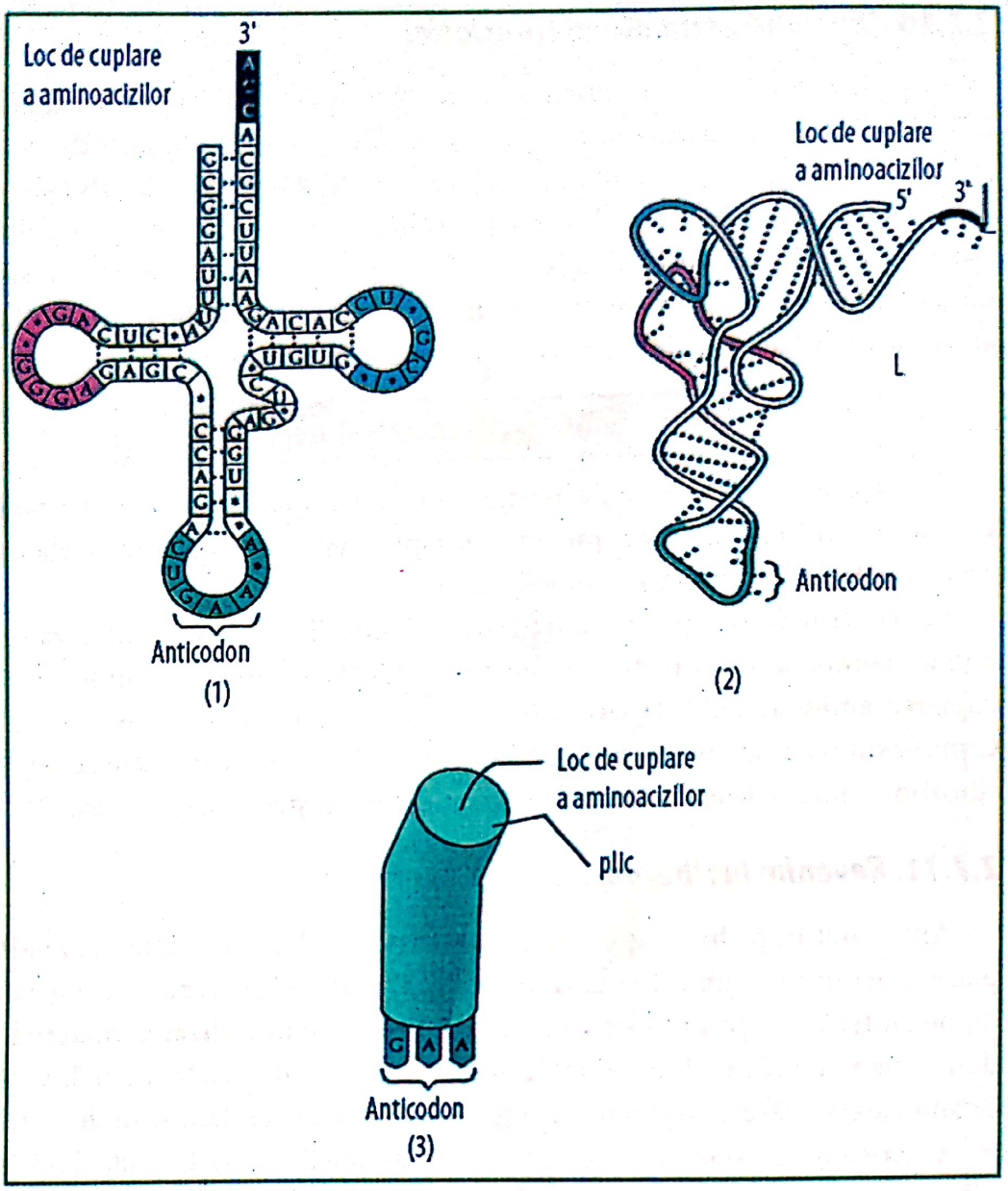


Fig. 86 – Structura moleculei de tARN

1) Structura bidimensională a unei molecule tARN specifică transportului aminoacidului fenilalanină. Se observă patru regiuni cu baze perechi şi cele trei funde (rozete), caracteristice pentru aproape toate formele tARN şi care furnizează o moleculă, cunoscută ca structură plată de cuplare, de lipire (excepţie de la această construcţie se întâlneşte la tARN-ul din mitocondrii). Pe poziţia a 3-a – final a moleculei se află locurile de cuplare pentru aminoacizi, care pentru toate tARN-urile deţin aceeaşi secvenţă de baze (5' – CCA – 3'). Întregul complex se prezintă ca un autocamion (tARN-ul) care pe poziţia CCA cuplează aminoacidul. În interiorul rozetei centrale (colorată în verde, se află anticodonul, în acest caz GAA, care este însă specific pentru fiecare tARN (bazele neobişnuite indicate cu steluţe se găsesc numai în tARN).

2) Reprezintă o prezentare a structurii tridimensionale aranjată în formă de L pentru o moleculă de tARN.

3) Reprezintă modul în care tARN va fi prezentat în capitolele următoare

(*modificată după Campbell şi colab., 2003*)

Scanned with OKEN Scanner

2.7.10. Controlul enzimatic al translației

Cuplarea codonului și a anticodonului reprezintă al doilea pas în procesul cunoașterii, foarte necesar pentru o translație exactă a mesagerului genetic. Acestuia însă trebuie să-i preceadă o legătură corectă între un tARN și aminoacidul său specific.

O moleculă tARN care se leagă specific la un codon pentru un anumit aminoacid este obligată să transporte, să aducă în ribozom numai acel aminoacid și nicidecum un altul. Această întâlnire și cuplare între aminoacidul indicat și tARN-ul destinat acestuia este înfăptuită de către o enzimă specifică denumită:

aminoacil–tARN–sintetază

Există o întreagă familie de asemenea enzime, mai exact câte una pentru fiecare aminoacid. Aceste enzime reprezintă în fapt „traducătorul", adică alela care traduce limba nucleotidică în limba aminoacizilor.

În „centrul de reacție" fiecare tip de aminoacil – tARN – sintetază se potrivește numai combinației corecte aminoacid + tARN-ul specific. Sintetaza catalizează cuplarea aminoacidului la tARN în 2 etape antrenate (energizate) de ATP (fig. 87). Complexul rezultat aminoacid – tARN este pus în libertate de către aceeași enzimă, în ribozom, unde se leagă de lanțul polipeptidic în creștere (vezi și anexa 9).

2.7.11. Revenim la ribozom

Am arătat în primul capitol al acestei cărți că ribozomul este acea particulă citoplasmatică în care are loc sinteza proteică. De fapt, el reprezintă o adevărată fabrică de biosinteză, al cărei randament, viteză și precizie în utilizarea materiei prime este de milioane de ori mai mare decât orice realizare industrială umană. Fără a intra în detalii care se găsesc în imensele tratate de biologie celulară și moleculară publicate în America și Europa (vezi lucrările lui Campbell A. Neil, 2000; Lodish și colab., 2001 ș.a.) ca și în numeroase reviste de superspecialitate, prezentăm o schemă după Campbell A.N. (ed. Spektrum, 2000 și Campbell și colab., 2003) în care se prezintă anatomia unui ribozom din care rezultă etapele ce se derulează aici pentru fabricarea proteinelor.

Din figura 88 rezultă că ribozomul intermediază și găzduiește pe perioada sintezei proteice legătura specifică între anticodounul tARN și codonul mARN.

Analizând anatomia ribozomului, o organită celulară în formă de ou cu un diametru de cca 25 nm și deci vizibilă la microscopul electronic, întâlnim și un alt tip de ARN, și anume ARN-ul ribozomal (rARN) repartizat pe 3 molecule care însumează împreună 60% din masa acestuia.

Deoarece, fiecare celulă conține mii de ribozomi, modelul rARN este cel mai frecvent și prezent în celule. Reținem pe deasupra și faptul că rARN-ul, spre deosebire de celelalte tipuri, în afară de rolul său funcțional în ribozom, îndeplinește și funcția de material de construcție.

Scanned with OKEN Scanner

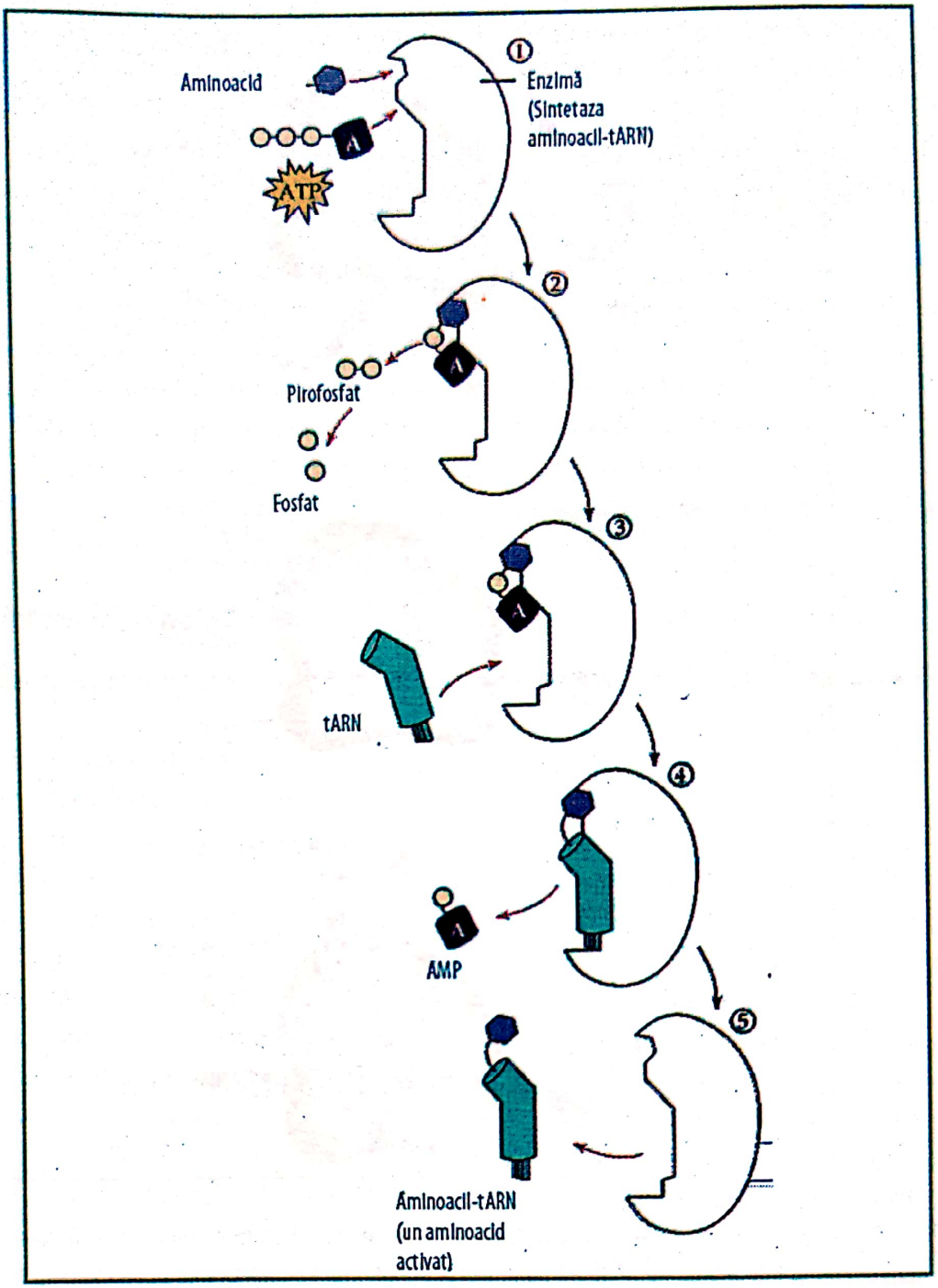


Fig. 87 – Modul de lucru al enzimei sintetaza–aminoacil–tARN.
Ea leagă tARN-ul cu acidul care i se potriveşte, care îi este predestinat. Legătura unui tARN cu aminoacidul său este o reacţie parţială, endergonică, care se derulează cu consum de ATP (adenozin-trifosfat).
(1) Centrul activ al enzimei leagă aminoacidul şi o moleculă de ATP.
(2) În condiţiile separării celei de a doua grupe fosfat, ca pirofosfat, se leagă ATP-ul de aminoacid, dar acum sub formă de AMP (adenozin-monofosfat).
(3) Acest fenomen uşurează legătura covalentă între tARN-ul potrivit şi aminoacidul său.
(4) În timp ce AMP-ul este eliberat,
(5) enzima cedează aminoacil – tARN-ul „aminoacidului activat". Are loc o aminoaciliere a tARN-ului care în fapt reprezintă traducerea din limba nucleotidă în limba aminoacizilor, iar aminoacil – tARN – sintetaza, este traducător (*prelucrare după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

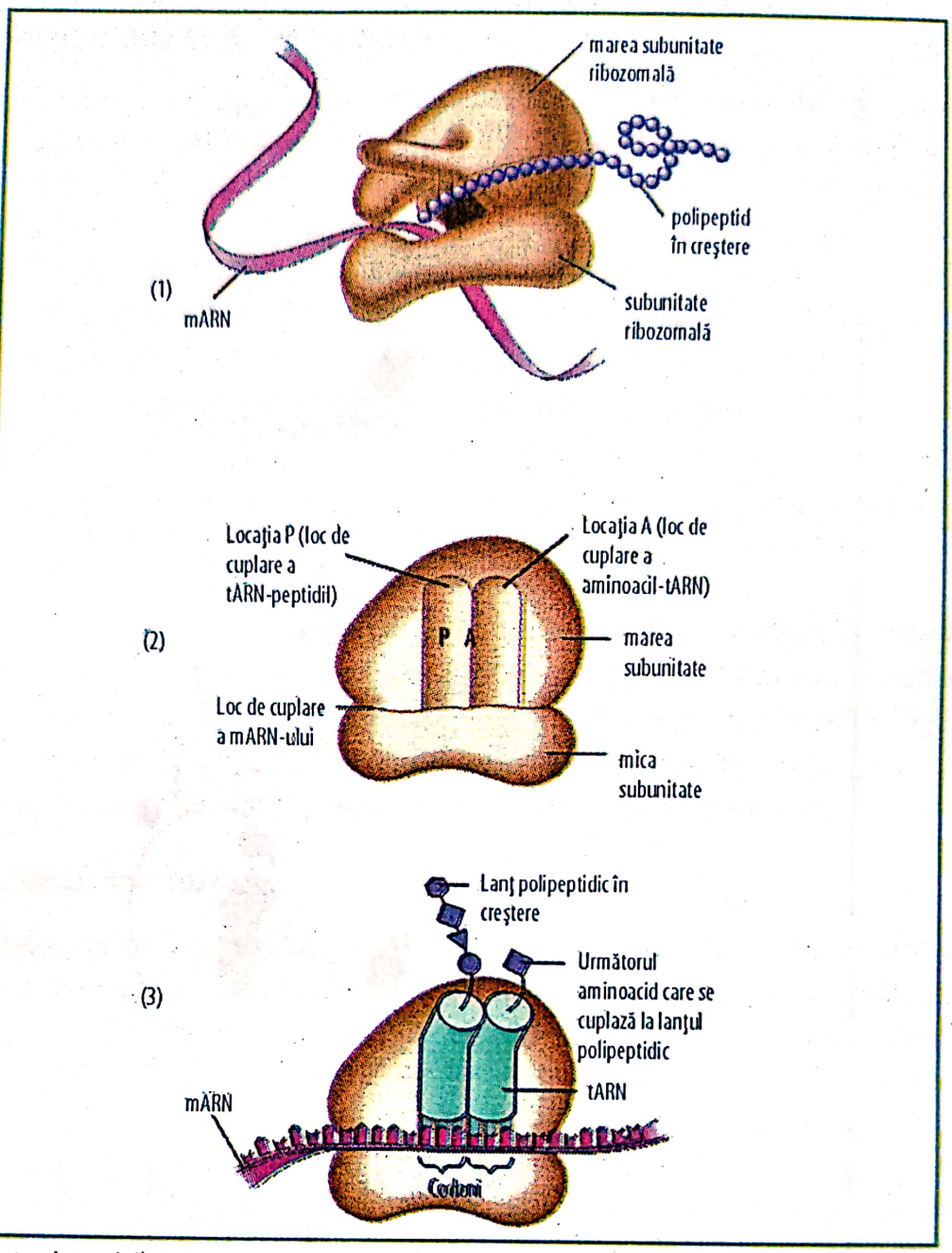


Fig. 88 – Anatomia unui ribozom.

1) Un ribozom funcţionabil constă din două subunităţi, fiecare formată din molecule de ARN, ribozomul şi numeroase alte proteine. Ceea ce se prezintă în desen este un model al unui ribozom bacterian, singurul care corespunde exact cunoştinţelor de până acum. Desenul indică esenţialul pentru înţelegerea detaliilor principiilor de funcţionare ale ribozomului.

Ribozomul eucariotelor este asemănător ca formă însă mai mare şi aceasta datorită unui conţinut mai mare de proteine (83 în total) şi a unor molecule mai mari de rARN.

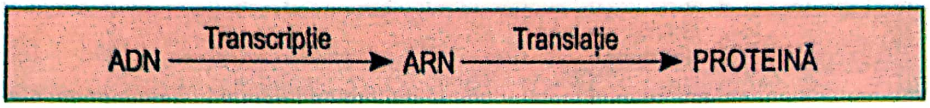
2) Ribozomul deţine lângă regiunea de fixare a mARN-ului şi două zone de cuplare a t-ARN-ului, indicate în desen cu P şi A. Aceasta este o versiune şi mai simplificată de construcţie a unui ribozom pe care o vom folosi.

3) O moleculă de tARN se potriveşte locului de cuplare numai dacă anticodonul ei şi codonul mARN formează împreună o pereche de baze. Locaţia P fixează numai acel tARN care este legat de lanţul polipeptidic în timp ce locaţia „A" acordă găzduire acelui tARN care aduce următorul aminoacid potrivit a fi cuplat la lanţul polipeptidic în creştere pe gruparea liberă carboxil a acestuia

(*prelucrare după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

Revenind la procesul mai complex al fluxului informaţiei genetice de la ADN-ul prezent în genele specifice fabricării proteinelor şi până la fabricarea lor practică în ribozomi, foarte pe scurt acesta este:



Decodificările recente încep să facă cunoscut care anume gene codează o proteină sau alta. Deşi informaţia este codată în ADN, procesul nu ar avea loc fără transformarea acestuia în alte forme de ADN, cum sunt:

mARN – Transportă informaţia genetică către fabricant (ribozom);

tARN } Reprezintă părţi ale aparatului care realizează sinteza proteică.
rARN } Aceste forme sunt sintetizate de către polimeraza ARN.

Rezultă deci că procesul de transcripţie n-ar avea loc fără finalizarea lui prin translaţie, adică prin sinteza proteică. ■

2.7.12. Sinteza unui polipeptid

Translaţia reprezintă procesarea polipeptidelor şi poate fi didactic împărţită în 3 etape:

- iniţierea sintezei;
- elongaţia, alungirea lanţului;
- finalizarea fixării şi finisarea lanţului în cauză.

În toate fazele acestea sunt necesari aşa-numiţi **factori proteici** care cel mai adesea sunt enzime, unele despre care deja am discutat şi care ajută mARN-ul, tARN-ul şi ribozomii în procesul de translaţie. Fiecare iniţiere şi elongaţie are nevoie de energie care este livrată de către GTP (guanin-trifosfat), o moleculă apropiată de ATP.

În timpul iniţierii translaţiei molecula de mARN, împreună cu una de tARN, şi cu primul aminoacid al polipeptidului şi cu cele două subunităţi ribozomale, formează un tot unitar de pornire (fig. 89). Subunitatea ribozomală mică fixează un mARN pe o secvenţă specifică de baze pe poziţia 5′ finală (în amonte, în stânga pe figură).

Imediat după aceea (în aval - dreapta figurii) în direcţia 3′ - finală, începe formarea codonului de iniţiere, AUG (codonul starter), cu care, de fapt, începe translaţia. tARN-ul iniţiator, care poartă întotdeauna aminoacidul metionină, se cuplează la codonul starter.

După reunirea mARN-ului, a tARN-ului iniţiator şi a subunităţii ribozomale mici apare şi subunitatea ribozomală mare şi, ca atare, se naşte ribozomul cu toate funcţiile sale active.

Proteinele pe care iniţial le-am denumit „factori de iniţiere" îşi unesc în felul acesta componentele lor, în această unitate funcţională. Aşa cum deja am arătat, celula are nevoie de energie pe care o primeşte sub forma moleculei GTP pentru formarea complexului de iniţiere. După finalizarea procesului de iniţiere, tARN-ul, iniţiator îl găsim poziţionat pe locaţia „P" a ribozomului. „Locaţia A" este pregătită pentru a primi următorul tARN.

Scanned with OKEN Scanner

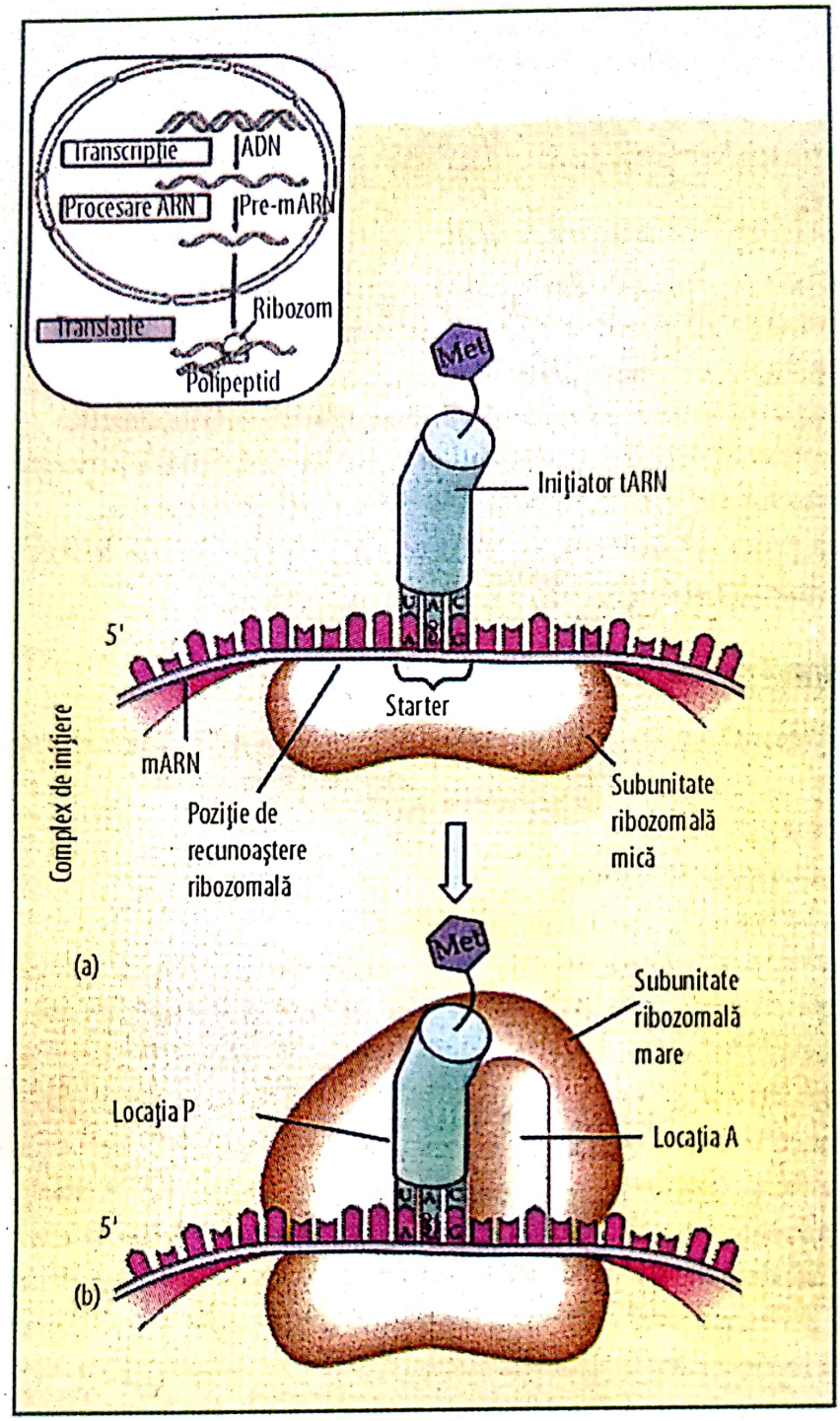


Fig. 89 – Inițierea translației.

1) O unitate ribozomală mică fixează o moleculă mARN. Cuplarea ribozomului la mARN se realizează prin intermediul unui loc, a unei poziții de recunoaștere de pe coloana mARN. În același timp se împerechează un tARN inițiator (anticodonul UAC) cu codonul starter AUG. Acest tARN deține aminoacidul metionină („met" pe desen).

2) Subunitatea ribozomală mare se leagă, se cuplează, cu complexul de inițiere. tARN-ul inițiator ajunge pe locația „P". Locația „A" rămâne disponibilă pentru tARN-ul care livrează următorul aminoacid. Ar mai trebui precizat că locațiile A și P pot fi practic considerate ca niște „rampe" de încărcare-descărcare a aminoacizilor care apoi vor fi livrați lanțului care formează polipeptidul (*după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

Elongaţia reprezintă procesul de alungire a lanţului polipeptidic prin aducerea sistematică a numeroşilor aminoacizi şi cuplarea lor la aminoacidul starter (metionina). Cuplarea unui nou aminoacid care participă însă la formarea mai multor proteine sunt denumiţi „factori de elongaţie". Elongaţia se desfăşoară în 3 faze conform desenului din figura 90, şi anume:

a) **Recunoaşterea codonului:** codonul mARN poziţionat pe locaţia „A" a ribozomului formează legături sub formă de punţi de hidrogen cu anticodonul unei molecule tARN pe care o întâlneşte şi care transportă aminoacidul potrivit necesar. Acest pas necesită hidroliza unei legături fosfatice a GTP-ului.

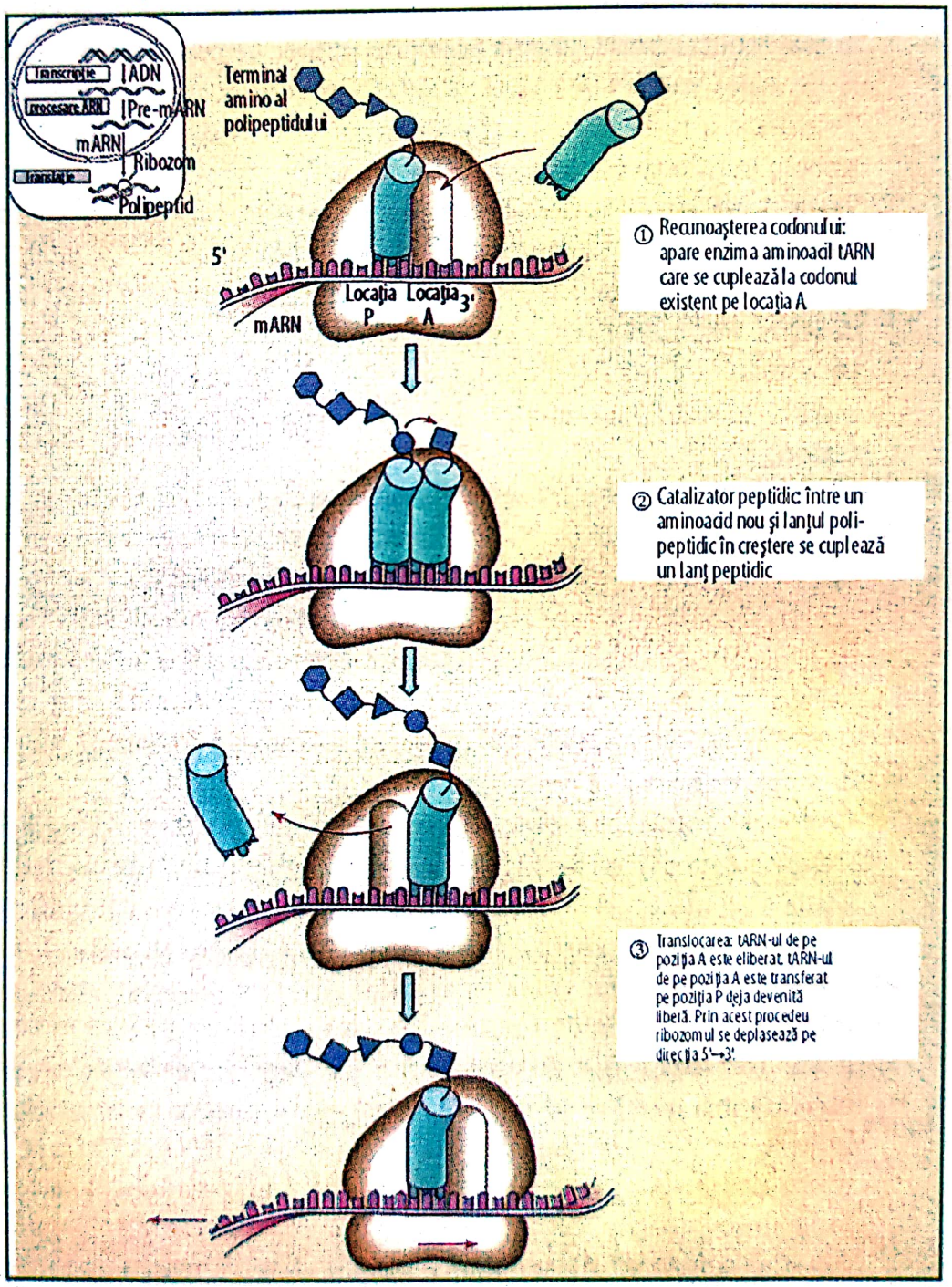


Fig. 90 – Cele 3 etape ale ciclului elongaţiei în translaţie (*după Campbell A.N., 2000*) (*vezi şi anexa 9, după Benjamin Lewin, 1998*)

Scanned with OKEN Scanner

b) **Formarea unui liant peptidic.** O componentă a subunității cromozomale mare, catalizează formarea unui liant polipeptidic între polipeptidul care atârnă pornind de pe poziția „P" și aminoacidul care tocmai s-a instalat pe poziția A. Tot în această fază se separă polipeptidul de tARN așezat în locația „P" și se leagă de aminoacidul tARN-ului din poziția A, mărindu-se lanțul.

c) **Translocarea.** tARN-ul de pe locația „P" se disociază de ribozom. tARN-ul de pe locația A care poartă acum lanțul polipeptidic în creștere este transferat pe poziția „P". Această reacție este catalizată de o enzimă foarte complexă denumită **peptidil-transferază.** În timpul schimbului de locații de către tARN anticodonul acestuia rămâne legat prin punțile de hidrogen de codonul mARN și de aceea mARN și tARN se mișcă în continuare ca o singură „unitate". Translocația reprezintă exact această mișcare prin care codonul următor ce trebuie translocat este readus pe locația „A".

Translocația necesită, firește, energie, pe care o procură prin hidroliza moleculei de GTP. mARN-ul se mișcă deci continuu pe direcția 5′ – final înainte prin ribozom (vezi săgeată) asemănător unui burghiu fără posibilități de întoarcere, de ieșire. Pe de altă parte, s-ar putea spune că ribozomul se mișcă ca un trenuleț pe coloana de mARN pe direcția 5′ → 3′. În ambele situații ribozomul și mARN-ul se împing unul pe altul în direcția convenită sigur, adică codon pe codon.

Acest ciclul al elongației atât de mult descris aici durează în realitate pentru fiecare aminoacid circa 60 milisecunde și se repetă de atâtea ori până când ultimul aminoacid a fost cuplat de lanțul polipeptidic.

d) **Finalizarea** (termination). Elongația se desfășoară numai atâta vreme până ce un codon terminal sosește și se așază în locația „A" a ribozomului. Tripleții speciali de baze cu însușiri de a stopa procesul de sinteză sunt UAA, UAG și UGA (fig. 91). Ei nu mai codifică nici un aminoacid ci transmit numai semnalul de stopare, încetare a procesului.

Codonul terminal pe locația „A" fixează o proteină denumită factor de eliberare (Release-factor în engleză). Acesta separă polipeptidul de ultimul tARN, prin adiția unei molecule de apă. Ribozomul eliberează deci atât polipeptidul cât și mARN-ul și se separă finalmente în cele 2 subunități ale sale.

e) **Polisomii** Un singur ribozom ar putea sintetiza un polipeptid de dimensiuni mijlocii în mai puțin de 1 minut. Cu toate acestea, o singură moleculă mARN poate translata simultan mai multe polipeptide, deoarece în același timp lucrează mai mulți ribozomi. De îndată ce un ribozom a trecut de codonul de inițiere, un al doilea ribozom se leagă de coloana mARN. De aceea, o întreagă grupă de ribozomi se deplasează în același timp de-a lungul aceluiași mARN, îndeplinind diferite secvențe din procesul de fabricare al polipeptidului.

Acest ansamblu de ribozomi ar fi trebuit să se numească „poliribozomi", dar din dorința de prescurtare oamenii de știință i-au zis „polisomi". Ei pot fi foarte bine observați la microscopul electronic (fig. 92).

Scanned with OKEN Scanner

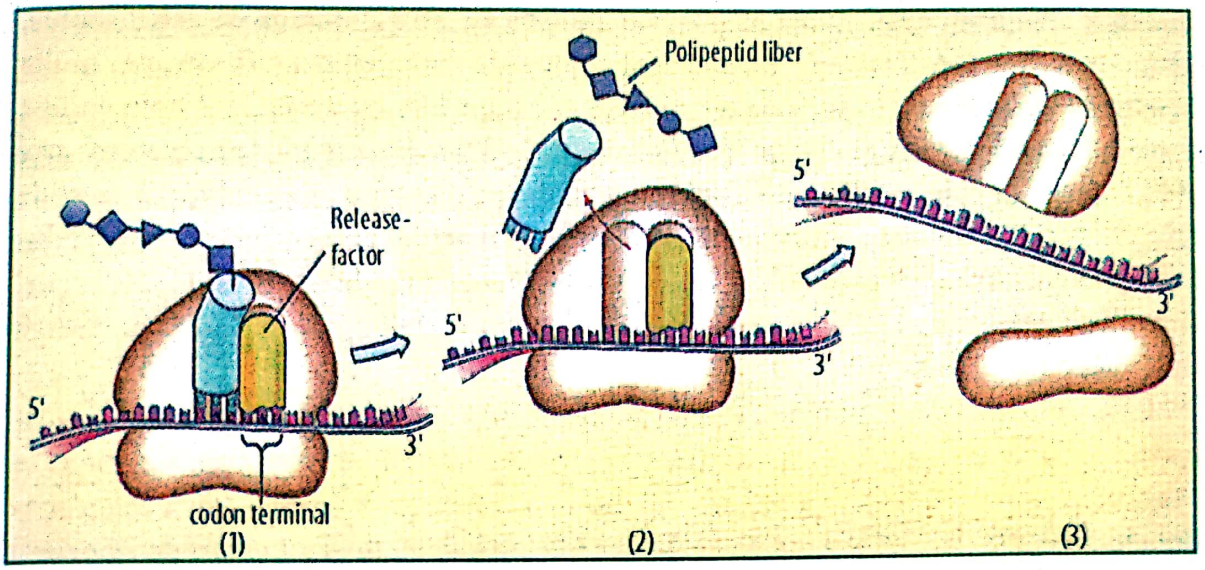


Fig. 91 – Finalizarea translației

1) Un codon terminal ajunge la ribozom și se așază pe locația „A" unde în locul unui tARN cuplează o proteină. Aceasta acționează ca Release-factor, adică factor de eliberare.

2) Acest Release-factor hidrolizează legătura dintre tARN de pe poziția P și ultimul aminoacid al lanțului polipeptidic. Atât polipeptidul cât și tARN-ul vor fi eliberați de către ribozom.

3) Complexul format din cele două subunități ribozomale și mARN-ul se dispersează

(*prelucrare după Campbell A.N., 2000*)

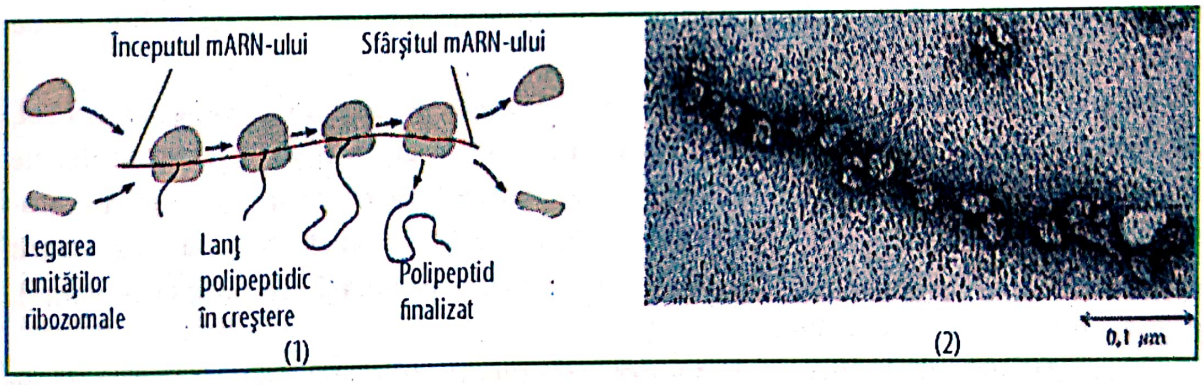


Fig. 92 – Prezentare a polisomilor

1) O moleculă mARN este translatată, de regulă, de mai mulți ribozomi. Acest ansamblu este denumit polisom (*Campbell A.N., 2000*)

2) Fotografia la microscopul electronic arată un polisom foarte mare într-o celulă a unei procariote (*după Halmako, Miller O.L.L, 1995*).

2.7.13. De la polipeptid spre o proteină cu însușiri funcționale

În timpul și după sinteza sa polipeptidul începe să se plieze spontan în spațiul disponibil, creându-și o conformație tipică unei proteine funcționabilă. Se formează o configurație tridimensională cu structură secundară și terțiară (anexa 7). Gena determină structura primară și aceasta la rândul ei determină conformația, configurația.

Este foarte posibil să se desfășoare și alte etape, de modificări posttranslație sau posttranslaționale, astfel încât proteina să poată să-și îndeplinească obligațiile sale

Scanned with OKEN Scanner

în celule. Anumiți aminoacizi ar putea fi modificați prin cuplarea de zahăr, lipide, grupe fosfatice etc. Enzimele ar putea să separe de polipeptid unul sau mai multe N-terminale (aminoacizi în zona terminală). Nu în puține cazuri un lanț polipeptidic tocmai format ar putea fi divizat în două sau mai multe fragmente. Insulina care este și ea o proteină este sintetizată inițial ca un polipeptid perfect; apoi mijlocul acestuia este înlăturat enzimatic și hormonul activ contra zahărului care apare este format din 2 lanțuri polipeptidice care se leagă între ele printr-o punte bisulfidică. În alte cazuri sunt sintetizate separat 2 sau 3 polipeptide, care apoi sunt asociate pentru formarea unei proteine.

Polipeptidele odată formate, în majoritate poartă un semnal genetic care le dirijează spre acel loc în celule, predestinat pentru activitatea lor. Așa cum s-a văzut în capitolul referitor la funcțiile celulei, s-a putut constata prin investigații la microscopul electronic că în celulele active în sinteza proteică se întâlnesc 2 tipuri de ribozomi (respectiv, polisomi), și anume: **ribozomi liberi** și **ribozomi legați**. Cei liberi sunt distribuiți în citosol și realizează acolo sinteza proteică. Alți ribozomi sunt legați de partea citosolică a rețelei endoplasmatice (RE). Aceștia sintetizează proteinele de construcție ale sistemului de membrane interne în special pentru membranele nucleare ale RE, ale aparatelor Golgi, ale libosomilor, ale vacuolelor ca și membranele plasmatice. Mai sunt sintetizate numeroase proteine de secreție. Printre ele se numără insulina, o proteină de secreție extrem de importantă. Fiabilitatea funcțională a ribozomilor este atât de mare încât cei legați se schimbă des cu cei liberi și invers, aceasta în funcție de necesitatea celulei și a faptului că aceștia sunt structural identici.

Nimic însă nu se face întâmplător. Sinteza tuturor proteinelor începe în citosol, numai dacă ribozomul declanșează (așa cum s-a văzut) translația unei molecule mARN. Polipeptidul în creștere decide singur dacă ribozomul rămâne liber în citosol sau dacă se leagă de RE. Proteinele de secreție sunt identificate de un așa-numit „semnal peptidic – N-terminal", alcătuit din circa 20 aminoacizi (un polipeptid scurt). Acest fenomen este prezentat în figura 93.

Secvența semnal, de îndată ce se separă complet de ribozom, este recunoscută de un complex de proteine ARN, denumit semnal de recunoaștere a particulelor – SRP (de la varianta engleză „Signal recognition particle").

Acest complex funcționează ca un adaptor, care leagă SRP-ul de membrana RE. Receptorul SRP este asociat cu un canal transmembrană prin care polipeptidul în creștere este împins în lumenul RE.

Sinteza proteică continuă acum în același ribozom cuplat la membrană, iar polipeptidul gata sintetizat se găsește automat în lumenul RE. Imediat semnalul peptidic este declanșat de către o enzimă.

În caz că molecula de mARN nu primește nici o informație pentru formarea unei **secvențe semnal**, ribozomul rămâne liber în citosol și acolo realizează translația. Secvența semnal se preocupă deci ca o proteină să ajungă la locul ei de destinație, în acest caz în lumenul RE. Există și alte modele de transport. Ele nu se diferențiază semnificativ de cel prezentat mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

În final, subliniem faptul că deşi modelul de sinteză proteică prezentat mai sus este aproape identic la procariote şi eucariote, aceasta nu înseamnă că nu există şi diferenţe. Ca organisme mai evoluate, eucariotele lucrează cu material mult mai purificat, enzimele celulelor acestora modificând mARN-ul în numeroase forme şi feluri înainte ca acest ambasador, mesager să fie transmis citoplasmei. ■

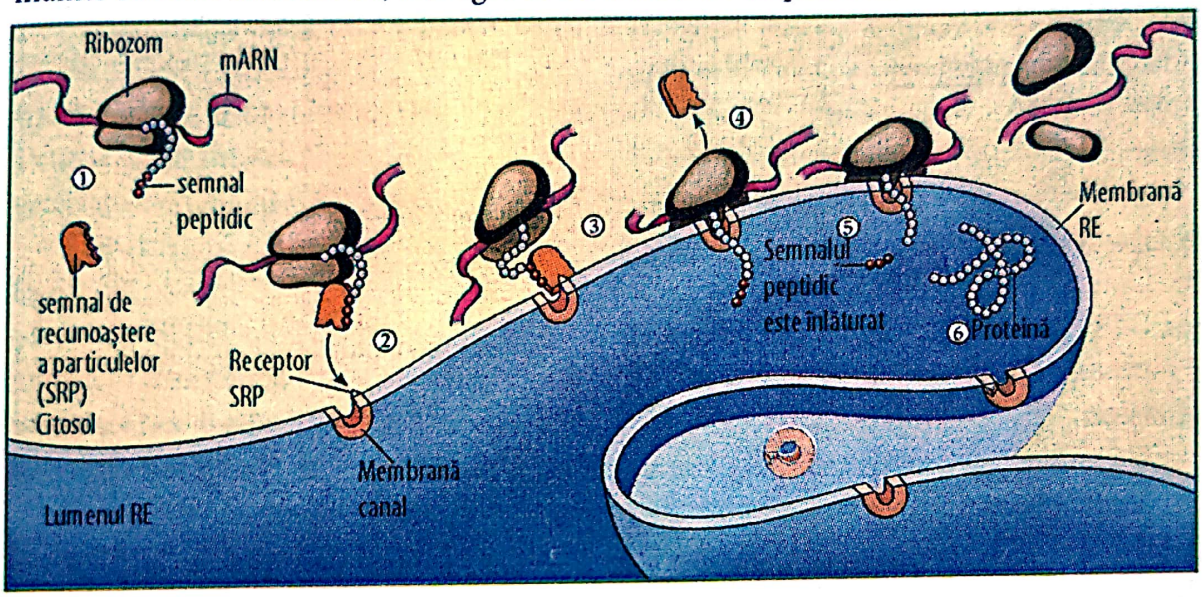


Fig. 93 – Model de dirijare genetică a transportului de proteine.
Numeroase polipeptide îşi încep lanţul cu un semnal polipeptidic, alcătuit dintr-o secvenţă de aminoacizi care orientează proteina spre anumite organite celulare, conform unei preplanificări.
(1) În această figură este prezentată o proteină de secreţie, adică o proteină planificată a fi eliminată din celulă, pentru a fi transportată spre reţeaua endoplasmatică.
(2) Un complex proteic denumit semnal de recunoaştere a particulelor (SRP), recunoaşte secvenţa semnalizatoare şi se leagă de ea.
(3) SRP-ul se leagă apoi de un receptor proteic al membranei RE.
(4) SRP-ul este eliberat în timpul creşterii polipeptidului printr-un canal proteic, strecurându-se în membrana RE.
(5) O enzimă înlătură şi semnalul proteic (*după Campbell A.N., 2000*)

2.7.14. Gena mozaic şi purificarea ARN-ului

Atâta vreme cât se află în nucleu inactivă, adică cât nu este obligată să transmită mesaje şi să coordoneze activităţi biochimice, o genă poate deţine şi material genetic denumit „inert" – neintegrat în activitatea genetică propriu-zisă.

În momentul însă în care gena în cauză este selectată din zecile de mii care alcătuiesc genomul (ADN-ul) în procesul de fabricare a ARN-ului are loc o purificare care se desfăşoară în momentul transcripţiei (fig. 94). Partea activă a genei denumită „exon" alternează cu părţi inactive şi deci nefolositoare denumite „intron". Procedeul utilizat constă în tăierea şi înlăturarea intronilor şi lipirea exonilor.

Lungimea medie a unei unităţi de transcripţie, adică a unei molecule ADN conţine circa 8000 nucleotide, motiv pentru care şi produsul ARN al acestei unităţi de transcripţie este, de asemenea, la fel de lung. Din acestea însă numai 1200 nucleotide sunt

Scanned with OKEN Scanner

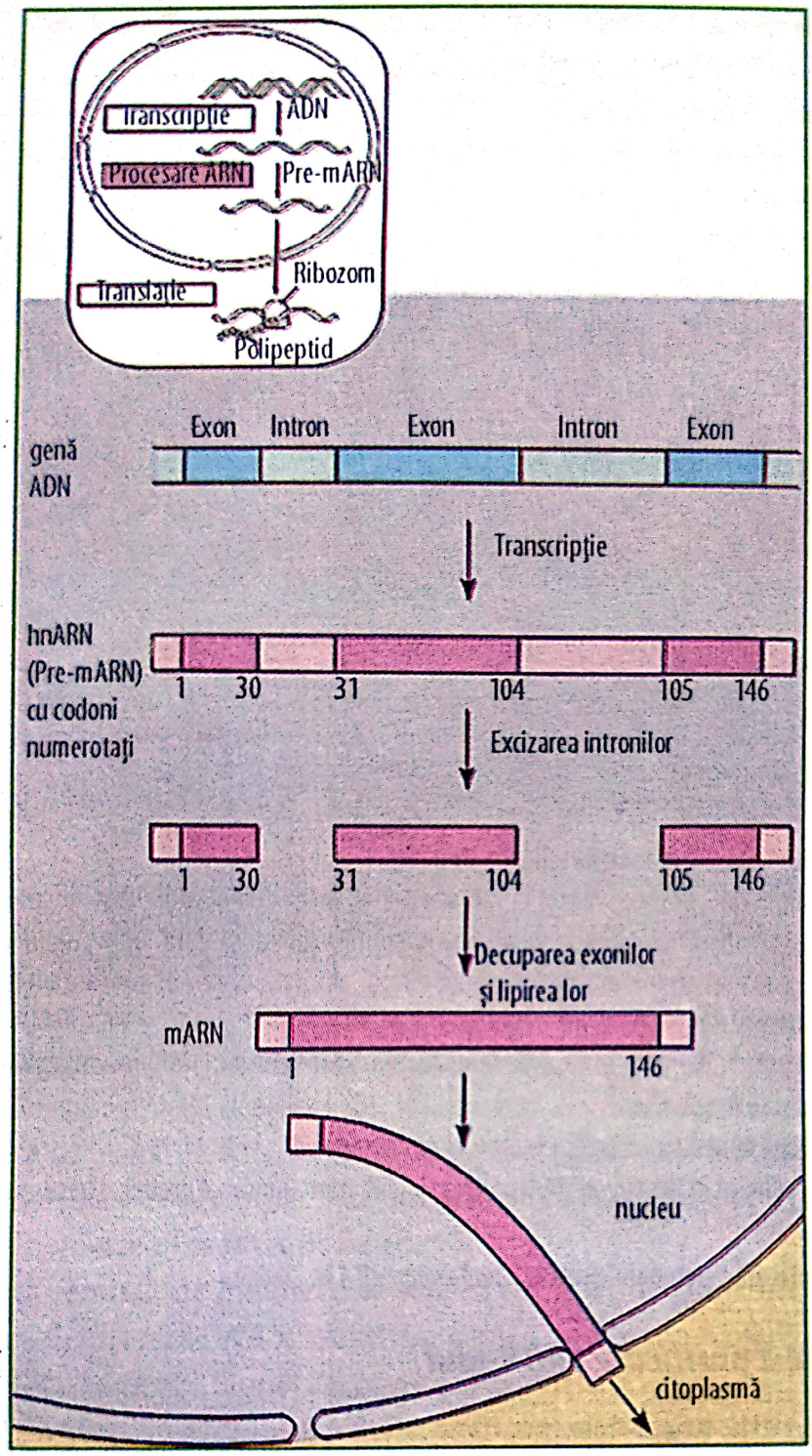


Fig. 94 – Procesarea ARN prin purificarea mARN.
Gena desenată în albastru codează aşa-numitul β-polipeptid, un lanţ specific hemoglobinei. Lanţul β este format din 146 aminoacizi, deci este un lanţ scurt. Gena responsabilă conţine 3 zone de codare, cunoscute sub denumirea de exoni (exon – singular). Exonii, material genetic activ care se exprimă, sunt separaţi între ei de către un material inert, care nu codează cunoscuţi ca introni (intron – singular).
În faza iniţială a procesării, întreaga genă este transcrisă într-un hnARN, adică un Pre-mARN. Înainte ca molecula să părăsească nucleul sub formă de m.ARN, intronii sunt secţionaţi, iar exonii sunt decupaţi şi eliminaţi. Intronii se sudează formând mARN-ul matur. Acesta va continua să deţină introni numai la extremităţi. Sub această formă va părăsi nucleul şi se va deplasa în citoplasmă spre ribozom (*prelucrare după Campbell, 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

utilizate pentru codificarea unui polipeptid de dimensiuni medii care conţine circa 400 aminoacizi (conform regulii că un aminoacid este codat de un triplet de nucleotizi). Ca urmare şi surprinzător, genele eucariotelor, cu ARN-ul transcris, conţin în lungimea lor secvenţe întregi de nucleotizi care nu codează (deci nici nu translatează) şi care însă se interpun între zonele active care codează (codifică). Cu alte cuvinte, şirul de nucleotide care codifică o proteină la eucariote nu este continuu, ci sub forma unui mozaic. **Gena stil mozaic** şi modul ei de funcţionare au fost descoperite simultan şi independent unul de altul de către Richard Roberts şi Phillip Sharp, în anul 1977. Pentru **gena mozaic**, descoperire de mare importanţă, mai ales pentru tehnologiile genetice, cei doi au primit în 1993 împreună Premiul Nobel.

Atât intronii cât şi exonii sunt transcrişi într-o mare moleculă ARN denumită şi moleculă pre-mARN, numită astfel din cauza caracterului ei ca ARN-heterogen nuclear, adică hnARN. O moleculă hnARN nu va părăsi niciodată nucleul. Molecula mARN care ajunge în citoplasmă este o versiune editată a transcriptului original şi aceasta pentru că enzimele taie şi elimină exonii din moleculă, aliniază şi cuplează exonii într-o moleculă curată de mARN cu un aranjament continuu de baze care codifică.

Purificarea ARN-ului prin procedeul posttranscripţie se întâlneşte în egală măsură la tARN şi rARN (vezi anexele 10 şi 11).

Procesul de purificare a ARN-ului este suficient de complicat şi în nici un caz clarificat în detaliu. Cercetătorii au stabilit totuşi că acesta este coordonat de o succesiune de câţiva nucleotizi localizaţi la extremele intronilor. Aceste scurte secvenţe sunt GT pentru începutul intronului şi AG pentru sfârşitul lui.

De aici a apărut şi regula GT-AG, valabilă numai pentru intronii genelor mozaic din nucleul celular care ar urma să fie transcrise în mARN.

Aceste mici particule semnal sunt denumite „mici proteine ribonucleice, nucleare" sau sn RNP, „s" provenind de la englezescul *small*, adică mic. Pentru uşurinţa exprimării, cercetătorii le-au denumit „snurps". ARN-ul cuprins în aceste particule este denumit snARN şi reprezintă o moleculă formată din 150 nucleotide. Deoarece în mod neobişnuit multe dintre nucleotide sunt pe bază de uracil, mai sunt denumite şi ARN-uri îmbogăţite în uracil sau u-ARN.

Unele particule snRNP se reunesc în anumite complexe mari care le-am putea denumi în româneşte purificosom (aparat de purificare, purificator) (Spleiβosom în germană); spleiβen înseamnă a purifica prin tăiere, eliminare şi recuplare a exonilor. Purificosonul interacţionează cu extremitatea finală a ARN-intronilor. Se pare că în acest loc specific, intronii se dizolvă oferind posibilitatea de a se uni. Această ipoteză foarte plauzibilă este prezentată în figura 95.

Ribozime. Tăierea şi purificarea altor ARN-uri transcripte cum ar fi de exemplu tARN-ul sau rARN-ul premergător se derulează după alte modele. Ca şi în cazul purificării mARN-ului se întâlneşte şi în acest caz un alt ARN care catalizează reacţia. În unele cazuri, aşa cum se întâmplă şi în cazul ciliatelor genului *Tetrahymena*, purificarea intronilor se desfăşoară fără participarea proteinelor şi în absenţa unor molecule suplimentare de ARN.

Scanned with OKEN Scanner

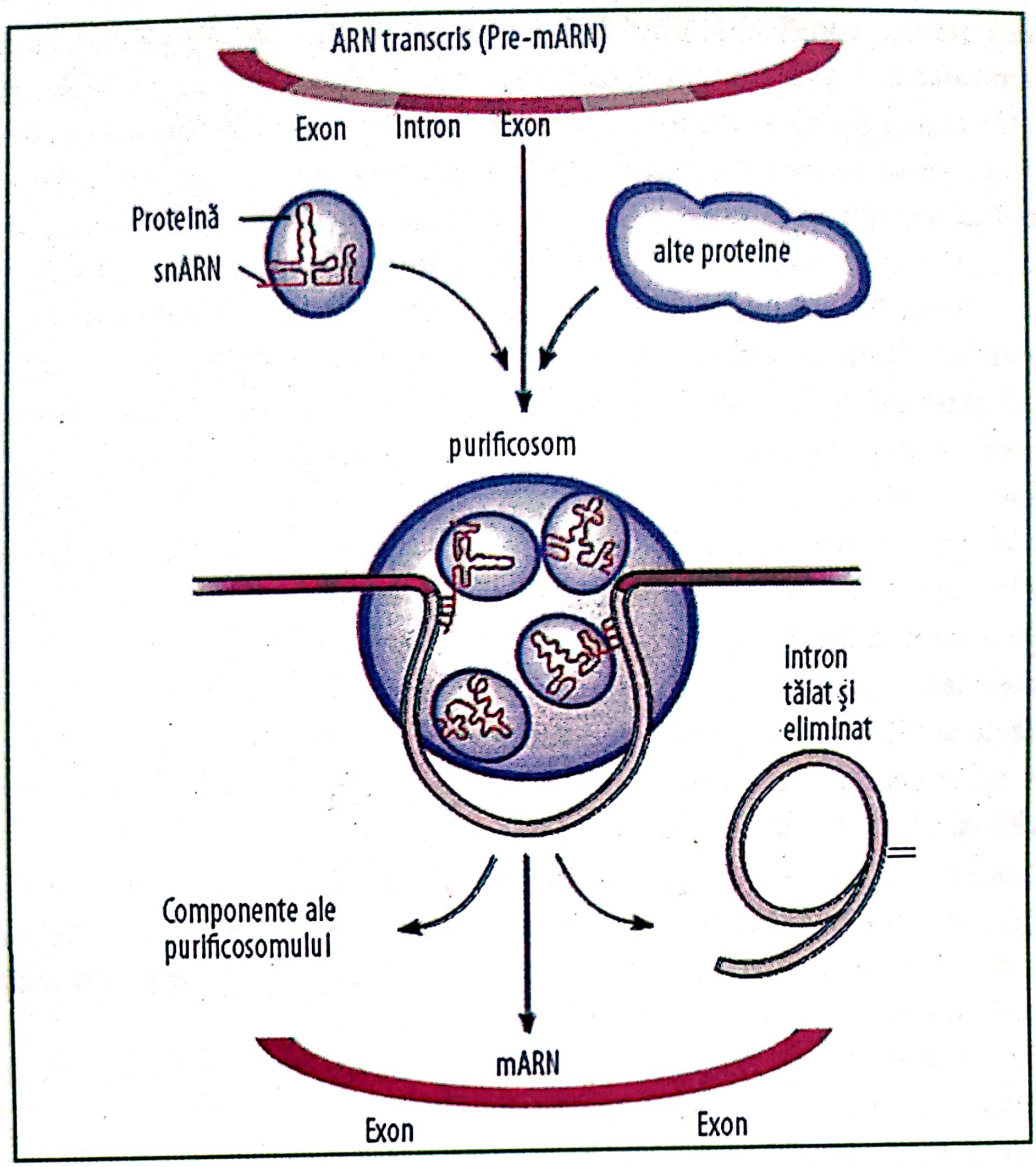


Fig. 95 – Rolul snRNP-urilor şi purificosomilor (purificatorilor) în purificarea mARN-ului. După ce o genă mozaic formată din exoni şi introni a fost transcrisă, mai multe particule snRNP şi alte proteine din pre-mARN se unesc şi formează un complex molecular pe care l-am denumit purificosom. În interiorul acestuia, snARN-ul anumitor snRNP-uri formează cu extremităţile anumitor introni o pereche de baze. Intronul este deci transbordat de purificosom. Apoi acelaşi intron este tăiat şi eliminat din ARN-ul transcris, iar exonii sunt uniţi unii de alţii. În final, purificosonul părăseşte ARN-ul transcris şi apare un mARN pur format numai din exoni care se transferă în citoplasmă (*prelucrat după Campbell A.N.*)

În fapt, în acest caz are loc o autocatalizare a acestui proces de către ARN-ul intronic propriu. Aceste molecule de ARN intronice care preiau şi funcţia **unor catalizatori au fost denumite ribozime.**

Descoperirea acestui foarte interesant proces a revizuit o regulă de bază a biologiei moleculare şi a chimiei vieţii conform căreia **toţi catalizatorii reacţiilor biochimice, deci biologice, sunt enzime proteice**. Ribozimele, făcând deci excepţie de la regula amintită, catalizează în anumite cazuri reacţia de purificare a ARN-ului.

Cercetătorii în biologie moleculară au mers mai departe şi au descoperit de curând că ARN-ul ribozomal are şi o funcţie catalitică în procesul efectiv al translaţiei. Spre

Scanned with OKEN Scanner

exemplu, se presupune, fără a fi pe deplin demonstrat, că legarea aminoacizilor la lanțul polipeptidic în creștere, în alungire, ar putea fi un ribozim.

În tabelul 96 prezentăm o sinteză a rolului pe care îl joacă diferitele molecule de ARN în sinteza proteinelor.

Capacitatea ARN-ului de a prelua atât de multe funcții se datorează stării tridimensionale ale diferitelor tipuri. ADN-ul reprezintă într-adevăr materialul genetic al celulei. ARN-ul însă reprezintă deja ceva mai evoluat, mai multilateral.

S-a demonstrat, de asemenea, că anumiți viruși folosesc ARN-ul ca material genetic. De altminteri, am afirmat anterior că în procesul formării vieții, ARN-ul trebuie să fi apărut înaintea ADN-ului.

Noile cercetări în domeniu au demonstrat deja că numeroase descoperiri socotite ca și concepte sigure în biologie, nu rămân ca atare pentru totdeauna, noile cunoștințe pot modifica percepții date de mult sigure.

De aceea, încheiem cu afirmația că dogmele nu au ce să caute în domeniul științelor.

Tabelul 96

Principalele tipuri de ARN prezente și active în celulele eucariotelor

Tipuri de ARN	Funcția îndeplinită
ARN mesager sau mARN	Transportă informația pentru o anumită secvență de aminoacizi ai proteinelor de la ADN către ribozomi.
ARN transfer sau tARN	Servește în procesul de sinteză proteică ca adaptor între codonii mARN și aminoacizi, transportă aminoacizii către ribozomi.
ARN ribozomal sau rARN	Joacă un rol structural și catalitic (ca ribozine) în ribozomi. Este material de construcție al ribozomilor.
ARN nuclear heterogen sau hnARN	Este un pre-mARN pe zonele codate și necodate ale ADN-ului (introni și exoni). Prin purificare pre-mARN este transformat în mARN.
Mici particule nucleare de ARN sau snARN	Joacă, de asemenea, un rol structural și catalitic (ca ribozim) în complexele moleculare purificatoare (purificatori), decuplând intronii din pre-mARN.

2.8. MUTAȚIILE GENELOR POT SĂ MODIFICE FUNCȚIILE UNOR PROTEINE

Foarte pe scurt, **mutațiile** mai sunt definite ca **modificări ale informației genetice a unei celule**. Rămânem deci la nivelul celulei pentru că, așa cum s-a mai arătat, celula este „cărămida de bază" a construcției individului, indiferent cât de complex ar fi. Fiecare celulă conține informația genetică a întregului organism. Într-un capitol anterior s-au prezentat mutațiile genomului și ale cromozomilor, în măsură să modifice comportamentul cromozomilor. În măsura însă în care am prezentat codul genetic și traducerea, transferul său în structura primară a proteinelor, putem acum să tratăm și problema mutațiilor genelor (genetice). Aceasta pentru că vom vedea într-un capitol viitor cât de importante sunt aceste cunoștințe, mai ales atunci când ne propunem, noi oamenii, să modificăm în folosul sau pentru rezolvarea necazurilor noastre aceste gene.

Scanned with OKEN Scanner

O mutaţie genetică presupune „anumite modificări" în structura arhitectonică a unei singure gene. Deoarece, o asemenea modificare nu schimbă comportamentul cromozomal, ele nu pot fi depistate microscopic. În caz că o mutaţie genetică ajunge într-un gamet, care la rândul său conduce la o fecundare, acestea sunt transferate zigotului şi pe această cale vor fi transmise cu mare probabilitate generaţiilor viitoare. În caz că mutaţia conduce la apariţia unui „**defect**" la fenotip, putem vorbi despre o „**boală a moştenirii**". Ca exemplu am putea aduce faptul că „anemia accelerată" îşi are originea într-o mutaţie genetică instalată pe **un singur nucleotid** într-o genă prezentă în amândouă tipurile de lanţuri polipeptidice care alcătuiesc hemoglobina (fig. 97).

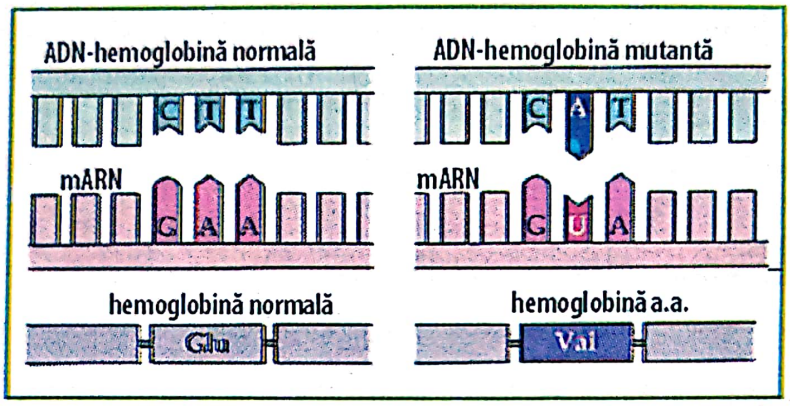


Fig. 97 – Gena sau alela care provoacă anemia accelerată (a.a.).
Se deosebeşte de gena normală prin modificarea, schimbarea unui singur nucleotid – **mutaţie punctuală**. Mai exact, pe locul unde în gena ADN-ului normal al polipeptidelor se afla baza timină T, gena mutantă (a.a.) conţine adenină (A). Acest schimb conduce la un codon modificat în m-ARN, care este transcriptibil de către această genă. Rezultatul este acela că pe lanţurile polipetidice aminoacidul valin înlocuieşte aminoacidul glutamin. Indivizii care vor purta această genă defectă (prin homozigot) vor deţine o hemoglobină aberantă, o deformaţie accelerată a celulelor roşii şi în formă de seceră. Acestea, la rândul lor, conduc la diferite simptome legate normal de anemia accelerată. Aceste modificări sunt prezentate în figura 98

Aşa cum s-a arătat, ADN-ul hemoglobinic mutant a suferit mutaţia prin înlocuirea timinei de către adenină, ceea ce a făcut să sufere modificarea şi în ARN-ul la care adenina a fost înlocuită cu uracil şi nu timina cum ar fi fost normal. De aici aberaţia în hemoglobină apare normală, informaţia transmisă pentru formarea unei hemoglobine normale fiind falsă.

Se pune, firesc, întrebarea: poate fi evitată o asemenea mutaţie genetică cu toate necazurile pe care le aduce sau dacă ea a fost indusă descendenţilor poate fi reparată?

Pentru prima parte a întrebării, răspunsul este mai simplu în sensul că părinţii pot evita contactul cu factorii mutageni care, de regulă, se găsesc în chimicalele din alimente, în aerul poluat, în contactul cu radiaţiile mutagene etc. La a doua parte a întrebării se lucrează în acest moment în marile laboratoare biotehnologice ale lumii, alături de numeroase alte boli cu transmitere ereditară. Aşadar vom reveni.

Scanned with OKEN Scanner

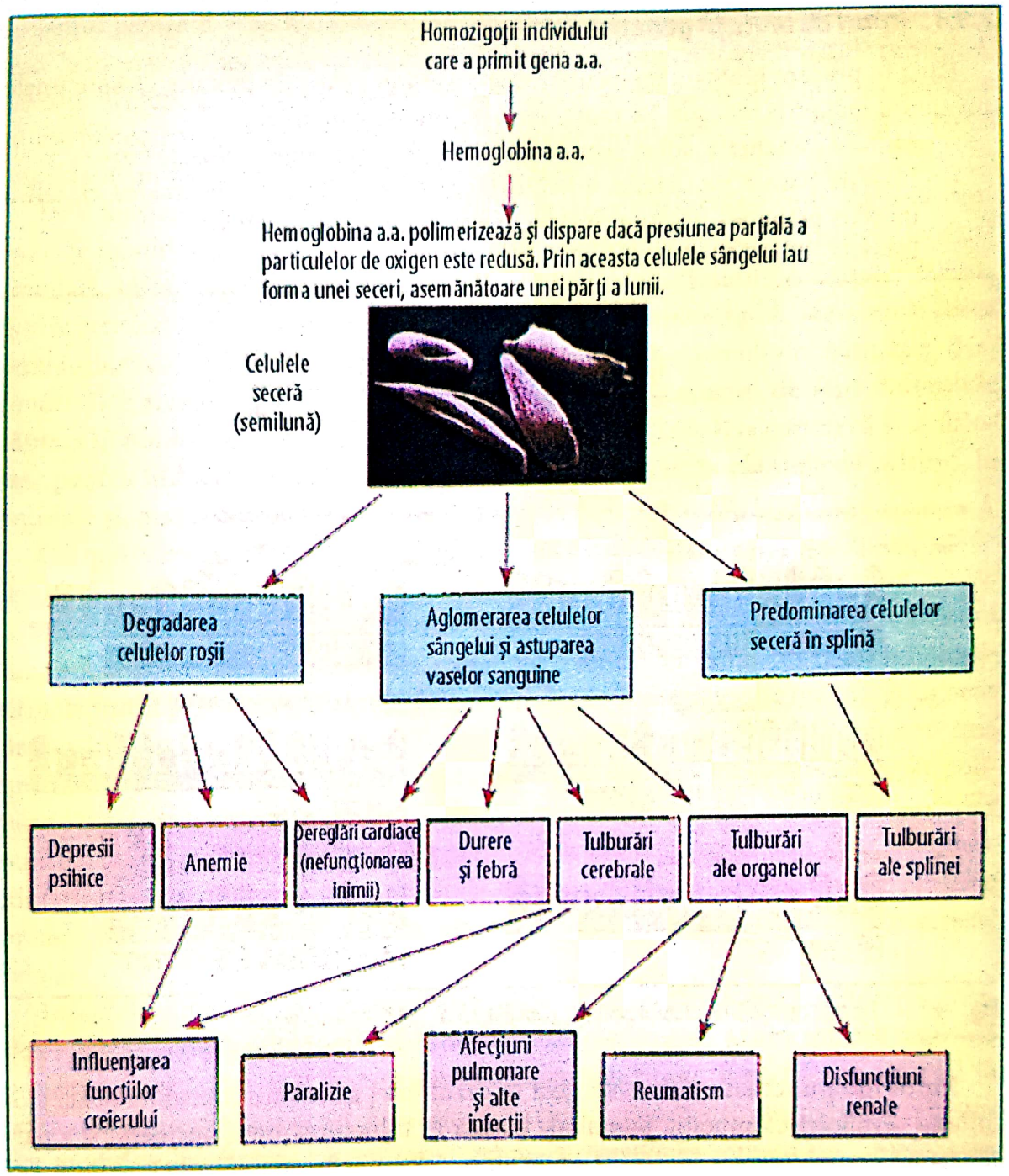


Fig. 98 – Acţiuni nefaste induse de gena celulelor seceră (a.a.)

La nivel molecular gena, alela recesivă (mutantă), are o acţiune directă asupra formei şi comportamentului celulei roşii. Celulele roşii ale sângelui creează o formă modificată a hemoglobinei. Dacă un individ moşteneşte aceste gene de la ambii părinţi, atunci toate moleculele hemoglobinice sunt modificate. Hemoglobina anormală deformează celulele sângelui şi declanşează o cascadă de boli şi simptome în întreg organismul. La nivelul întregului organism gena celulelor seceră sau gena semilună (a.a.) dezlănţuie o activitate pleiotrofică (de destrămare) adică apar foarte multe efecte fenotipice (*Lodish şi colab. 2001, prelucrare*)

Scanned with OKEN Scanner

2.8.1. Tipuri de mutații genetice

Până în prezent biologia moleculară cunoaște trei grupe de mutații. Despre unele din ele s-a mai scris mai sus. Pe scurt, acestea sunt următoarele:

- Mutații punctuale, adică ceea ce numim substituția perechilor de baze.
- Inserția bazată pe deleție, adică extragerea unei baze și inversarea ei, adică inserția pe un alt „loc" decât cel normal în molecula mARN.
- Inserția și deleția a 3 nucleotide (fig. 99).

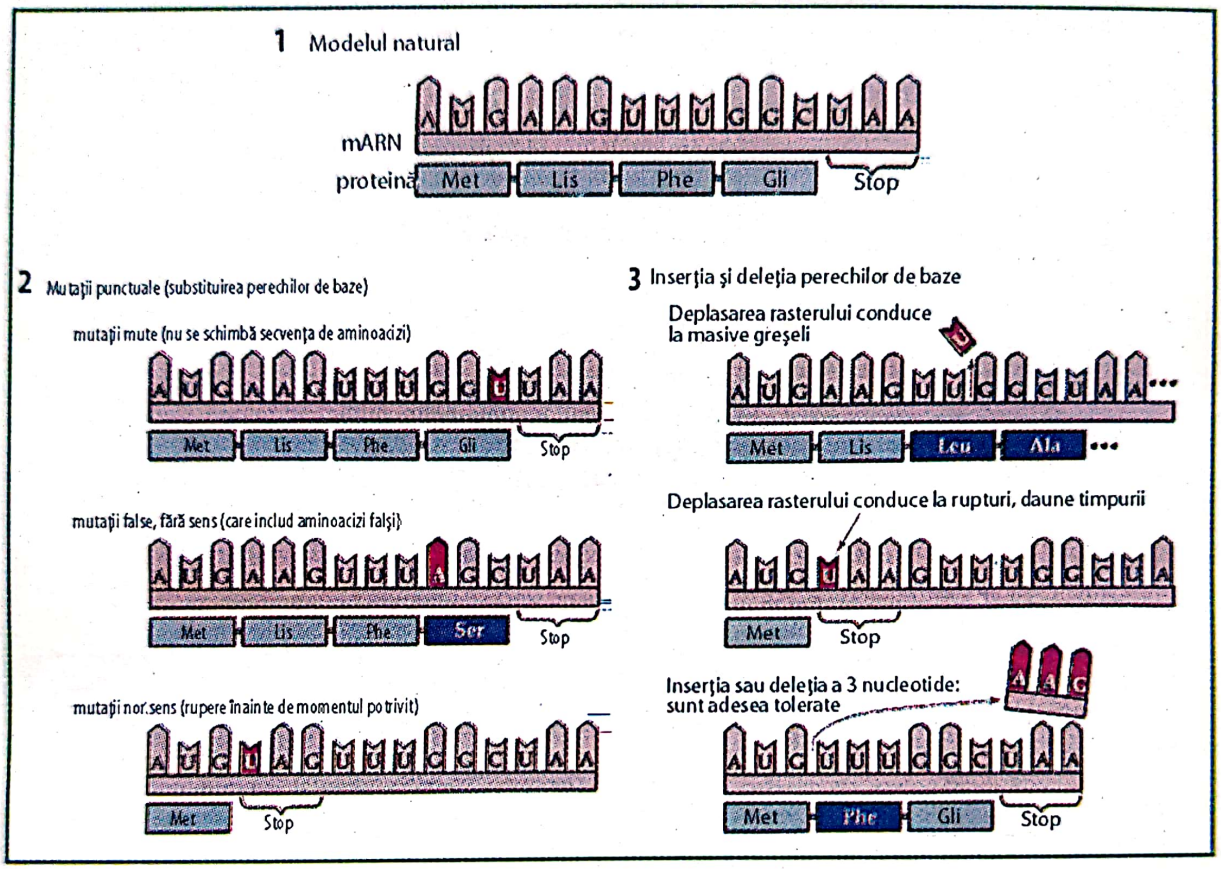


Fig. 99 – Diferite categorii de mutații genetice (*Campbell A.N., 2000 – prelucrare*)

Mutațiile punctuale: s-a arătat deja în cazul unei gene care transmite boala globulelor semilună că mutația punctuală constă în înlocuirea unui nucleotid și a partenerului complementar pe lanțul ADN cu o altă pereche de nucleotizi. Majoritatea acestor mutații sunt active și provoacă mari probleme organismelor care le dețin. Unele substituții însă sunt considerate ca „mutații mute" și aceasta pentru că ele nu se manifestă, adică nu transmit o informație activă inductivă a răului sau binelui, după caz. Fenomenul se datorează redundanței codului genetic care blochează acțiunea de codare a proteinelor. Există în lanțul ADN al genei o zonă care „nu codează", adică nu stochează informație transmisibilă. De regulă, mutația mută se plasează în această zonă a genei. Această zonă mai este denumită și intron (vezi fig. 94). Mutații mute pot fi induse și în exoni, adică acolo unde domină nucleotizi plini de informație. În acest caz însă are loc un schimb al perechilor de baze de la un codon la altul care traduc, transferă informația aceloraşi aminoacizi, fără a modifica succesiunea aminoacizilor

Scanned with OKEN Scanner

pe lanțul peptidic. Alte modificări ale perechilor de nucleotizi ar putea totuși conduce la formarea altor aminoacizi, dar fără a influența semnificativ funcțiile proteinei. Aceasta presupune că noul aminoacid înlocuitor ar putea să aibă însușiri similare cu cel înlocuit sau că acest schimb s-ar produce într-o zonă a proteinei mai puțin importantă pentru funcțiile acesteia.

De o foarte mare importanță sunt însă acele mutații punctuale care cauzează proteinelor modificări ușor de recunoscut. Schimbarea unui singur aminoacid în zona esențială, adică undeva în centrul activ al proteinei poate să modifice în mod semnificativ activitatea acesteia. Există și situații în care mutațiile conduc la îmbunătățirea proteinelor sau la obținerea unor variante care induc organismului mutant ca și descendenților acestuia unul sau mai multe avantaje. **Acestea sunt de fapt mutantele căutate în biodiversitate pe care specialiștii în biotehnologii le conservă și le folosesc pentru inducerea unor însușiri și caractere pozitive, la plantele de cultură, la animale și, mai recent, la om (vindecarea unor boli moștenite).**

Cel mai adesea însă mutațiile punctuale sunt dăunătoare, inutile și conduc la proteine puțin active sau care pur și simplu influențează negativ funcțiile celulare.

Cu alte cuvinte, mutațiile punctuale în mod obișnuit, și în cea mai mare măsură sunt **nonsens**, în engleză „non-sense mutations"; aceasta înseamnă că **tripletul modificat** deține în permanență încă un aminoacid și prin aceasta devine un codon cu **sens deplin**, însă nu în **direcția, în sensul corect.** Dacă însă o mutație punctuală transformă un aminoacid într-un codon-stop (final), translația se termină mai devreme, iar polipeptidul care rezultă este mai scurt decât dacă ar fi codat de o genă normală. Mutațiile punctuale care transformă un aminoacid codon într-un stop-codon sunt denumite **mutații nonsens**. Aproape toate mutațiile nonsens conduc la formarea unor proteine proaste, fără valoare funcțională, un consum inutil de energie al complexului genetic celular.

Inserțiile, delețiile și inversiunile rezultă prin intercalarea sau, dimpotrivă, pierderea uneia sau mai multor perechi de nucleotide dintr-o genă. Aceste mutații imprimă proteinelor rezultante o activitate dominantă ca substituții. Pentru că mARN-ul în translație este citit ca o serie de nucleotizi tripleți, inserția și deleția nucleotidelor pot modifica decodorul (separarea în tripleți). Asemenea mutații tip **„deplasarea rasterului"** apar întotdeauna atunci când numărul nucleotidelor intercalate sau al celor deleționate nu este un multiplu de 3. Asemenea nucleotide de după deleție sau inserție nu se mai află în decodorul adevărat și acest lucru conduce mai devreme sau mai târziu la un triplet nonsens, adică la finalizarea prea timpurie a translației. Dacă porțiunea de raster deplasată nu este în apropierea terminalului genei, atunci cu siguranță se va ajunge la o proteină nefuncțională.

În derularea evoluției asemenea modificări care nu conduc la deplasări pe raster sunt tolerate în cea mai mare parte. În cazul inversiei finalmente un segment al dublu-helixului este tăiat și eliminat și repoziționat greșit pe aceeași zonă. Activitatea acestui gen de mutații diferă de la o situație a alta, de la un caz la altul.

Scanned with OKEN Scanner

2.8.2. Mutante

Sunt acele organisme care au suferit modificări fenotipice şi funcţionale, urmare a mutaţiilor genetice. Hermann Müller, cercetător renumit pentru viziunile sale asupra acestui fenomen, a observat în anii '20 ai secolului trecut o creştere a frecvenţei daunelor genetice dacă musculiţa oţetului a fost tratată cu radiaţii röntgen. Folosind această metodă, Müller a putut să-şi obţină propriile mutante necesare studiilor sale genetice. Radiaţiile röntgen, ca şi alte forme energetice de radiaţii, nu sunt folosite numai în laboratoare. Ele reprezintă astăzi un pericol real pentru toţi aceia care lucrează cu ele în medicină sau industrie.

Între timp s-au descoperit numeroşi alţi agenţi mutageni de natură fizică şi chimică, de producţie antropică sau naturală.

Modul lor de apariţie este foarte diferit şi atunci când nu se află sub presiunea unui agent mutagen:

- greşeli în replicarea ADN-ului
- greşeli în repararea sau recombinarea acestuia, conduc la apariţia mutaţiilor punctuale, inserţiilor, deleţiilor sau inversiunilor; mutaţiile care rezultă ca urmare a unor greşeli în funcţionarea mecanismelor genetice ale celulei sunt denumite „mutaţii spontane".

Un număr important de influenţe fizice şi agenţi chimici interacţionează cu ADN-ul şi creează pe această cale mutaţii. Aceşti agenţi sunt denumiţi agenţi mutageni sau, simplu, mutagene.

Să recapitulăm aceşti factori:

a) **Fizici:**
   - razele röntgen;
   - căldura şi mai ales alternaţia cald - rece, amplitudinile mari;
   - razele ultraviolete (UV);
   - lumina, mai ales în componenta UV provenită de la soare creează dimere fiminice ale ADN-ului - adevărate rupturi.

b) **Baze analogi**
   Sub această denumire înţelegem anumite grupe chimice care deţin o structură chimică asemănătoare cu a bazelor azotate normale care construiesc ADN-ul. Analogii pot să înlocuiască, cu relativă uşurinţă, pe cele originale şi să conducă la apariţia unor perechi incorecte de baze.

c) **Substanţe care se intercalează**
   Sunt, de asemenea, substanţe chimice care se intercalează şi preiau rolul unui nucleotid în molecula de ADN urmând să cauzeze, prin replicare, **o deplasare a rasterului**. În laborator, în acest scop, este folosit produsul **Ethidiumbromid**. Cercetătorii dispun de numeroase metode pentru a testa potenţialul mutagen al diverselor substanţe chimice. Cea mai simplă şi utilizată este **testul Ames**, pus la punct de Bruce Ames, microbiolog care a dezvoltat acest procedeu folosind culturi bacteriene, îndeosebi *Salmonella*.

Scanned with OKEN Scanner

Revenim asupra definiției genei

Ținând cont de evoluția cercetării de specialitate de la Mendel și până în zilele noastre, de dinamica excepțiilor de la reguli considerate drept tabu sau dogme, ar fi potrivit să concluzionăm următoarele:

a) Ipoteza o genă - un polipeptid ca și mai vechiul concept o alelă - un caracter, ar trebui să fie limitată din următoarele motive:
   - genele celor mai numeroase eucariote conțin segmente lungi de material genetic care nu pot coda, adică nu dețin informație (intronii), acestea, în consecință, rămân fără corespondență, reprezentare în polipeptide;
   - majoritatea cercetătorilor în biologie moleculară includ în noțiunea de genă inclusiv promotorii și alte elemente regulatorii ale ADN-ului. Aceste secvențe ale genei nu sunt transcriptibile însă pot fi cuantificate ca parte a funcționalității genelor, deoarece sunt esențiale pentru transcripție (acțiune conexă).

b) O definiție elaborată a genei ar trebui să fie suficient de cuprinzătoare, încât fiecare moleculă ADN incluzând rARN, tARN și snARN să fie capabile să codeze. De aceea, considerăm că definiția dată de Campbell A. Neil (2000) este mai potrivită.

DEFINIȚIE

O genă este un segment de ADN, destinat fabricării unei molecule de ARN.

Din punctul nostru de vedere, acceptând această definiție, considerăm că ADN-ul reprezintă forma conservată a ARN-ului. ADN-ul nu se poate exprima fără ARN. Acesta este, poate și motivul pentru care se consideră că ARN-ul a fost primul material genetic apărut în procesul evoluției, el având nevoie de ADN pentru a conserva informația pe care singur a acumulat-o în milioane de ani de existență a lumii vii.

Recapitulând, trebuie să subliniem că informația genetică se exprimă prin translația în proteinele necesare unor structuri specifice, structuri care, la rândul lor, se manifestă exterior prin fenotipul unui organism. În figura 100 se prezintă în sinteză întregul drum de la genă la proteină. Genele, la rândul lor, sunt supuse unui proces de regularizare denumit **„control al expresiei genelor"**. Acest sistem de control permite, de exemplu, unei bacterii să regularizeze cantitatea diverselor enzime necesare schimbului de substanțe ale celulei.

La eucariote, sistemul de control al expresiei genelor permite celulelor care dețin ADN identic ca în timpul evoluției organismului să diferențieze în diferite tipuri de celule care alcătuiesc țesuturile și organele (mușchi, creier, ficat etc.).

Despre acest sistem de regularizare și control vom vorbi în sinteză în capitolele următoare, dată fiind marea lor importanță pentru dezvoltarea biotehnologiilor moleculare.

Scanned with OKEN Scanner

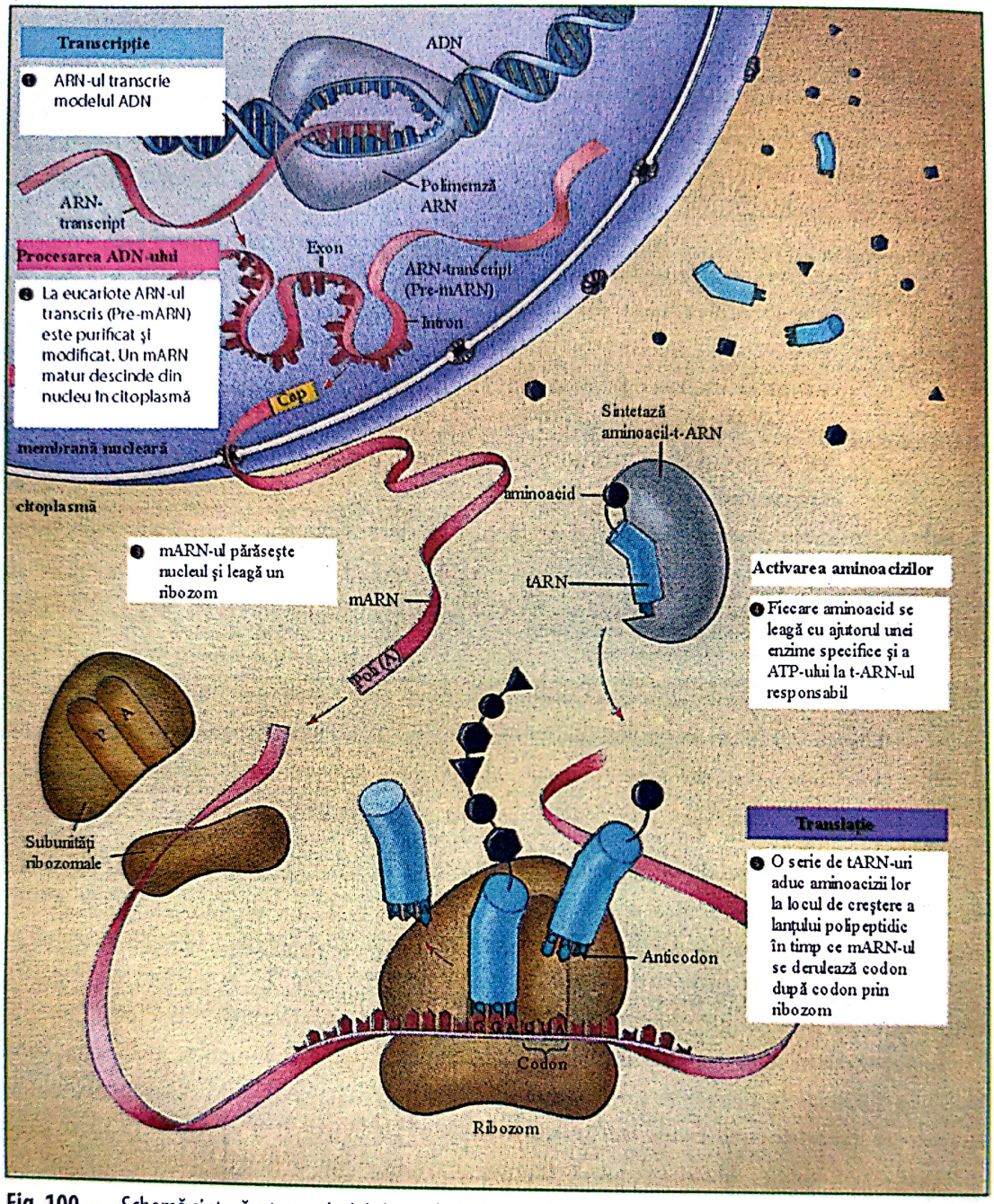


Fig. 100 – Schemă sinteză a transcripției și translației la eucariote.
De regulă, procedurile și etapele sunt asemănătoare la celulele procariote și eucariote. Diferența esențială constă în modul de procesare al ARN-ului în nucleele celulare ale eucariotelor (*Campbell A.N., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

3. DESPRE GENETICA VIRUSURILOR ŞI A BACTERIILOR

3.1. INTRODUCERE

De ce este necesară tratarea acestui subiect în această carte? Pentru simplul motiv că biologia moleculară s-a născut în primul rând în laboratoarele microbiologilor, acolo unde au fost şi sunt studiate virusurile şi bacteriile. Microbiologii au fost acei cercetători care au livrat cele mai numeroase dovezi despre faptul că ADN-ul este materialul care transmite însuşirile moştenite. Tot microbiologii au clarificat fenomenele de bază ale replicării, transcripţiei şi translaţiei, cele trei procese cheie ale fluxului informaţional genetic.

Virusurile şi bacteriile reprezintă cele mai simple sisteme biologice, adică acele modele în care cercetătorii au putut cu mai multă uşurinţă să stabilească legile mecanismelor moleculare ale vieţii.

În acelaşi timp, ele au devenit sisteme model, ale cercetării biologiei moleculare, deoarece ajută biologii nu numai în cunoaşterea şi înţelegerea mai bună a geneticii moleculare, ci mai ales pentru faptul că aceste mecanisme speciale sunt de o importanţă enormă pentru practică, pentru înţelegerea patogenităţii virusurilor şi a bacteriilor. Legat de această ştiinţă şi de scopul acestei cărţi, cunoştinţele din această interesantă zonă a sistemelor de viaţă aduc un aport semnificativ pentru tehnologiile moleculare, pentru manipularea genelor şi a transferului acestora de la un organism la altul. Aceste noi tehnici au deci o valoare deosebită, atât pentru cercetarea fundamentală cât şi pentru aplicarea biotehnologiilor moleculare.

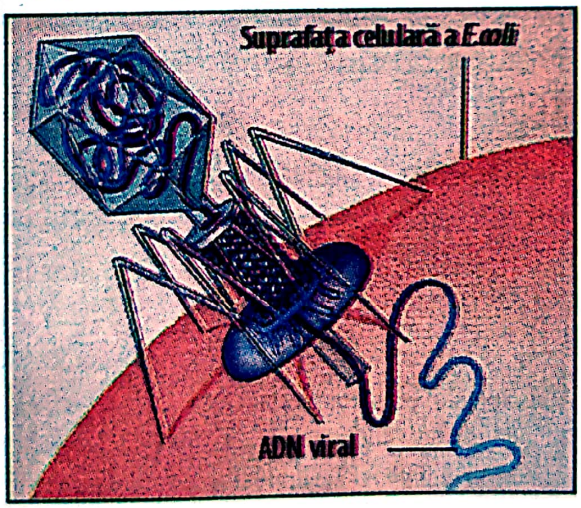


Fig. 101 – Infecţia unei celule de către un virus.
Primul pas al unei valoroase descoperiri biologice. Virusul injectează propriul său ADN în celula gazdă, în acest caz *E. coli*, iar virusul este fagul T4 (*Campbell A. Neil, 2000*)

Virusurile sunt entităţi ale vieţii mult mai mici şi mai simplu alcătuite decât bacteriile (entităţi unicelulare). În comparaţie cu celulele, structurilor virale le lipseşte schimbul de substanţe. În cele mai multe cazuri virusurile de abia pot fi identificate ca agregate de acizi nucleici şi proteine înconjurate de o membrană proteică. Am putea

Scanned with OKEN Scanner

spune că virusurile sunt un fel de gene ambalate. Spre comparație, în figura 102 se prezintă raportul de mărime între virusuri, bacterii și celulele eucariotelor.

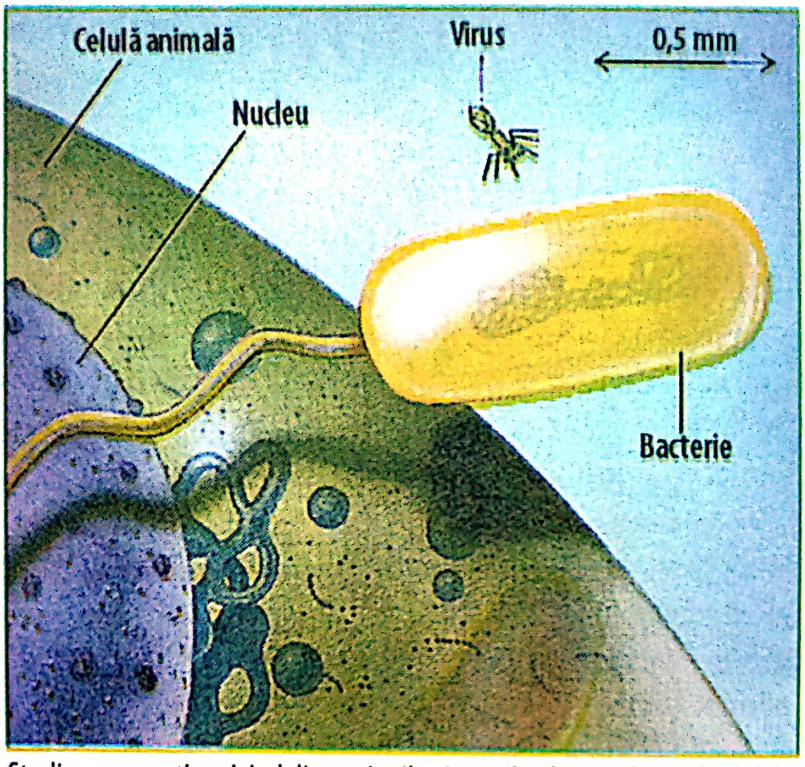


Fig. 102 – Studiu comparativ privind dimensiunile virusurilor, bacteriilor și al celulelor eucariote. Deși foarte simple ca structuri vii, virusurile și bacteriile au oferit cercetătorilor primele informații asupra complexelor mecanisme ale eredității. Apoi s-a mers de la simplu la complex, dovedindu-se că materialul ereditar este similar indiferent pe ce scară de evoluție se află organismele. Aceasta este prima și cea mai concludentă dovadă a unității lumii vii și complexelor interrelații între diferitele sisteme vii ale biosferei

3.2. DESCOPERIREA VIRUSURILOR

Dacă n-ar fi existat tutunul ca plantă dăunătoare, dar folosită de oameni, cultivată și atent îngrijită pentru a satisface gustul ciudat al fumătorilor, virusul n-ar fi fost probabil descoperit în secolul XIX. Un cercetător german pe nume A. Mayer a observat în 1893 că frunzele de tutun din cultura unui țăran capătă o culoare mozaicată, iar planta se dezvoltă sub formă de tufă, producția scăzând dramatic. Căutând cauzele acestei boli denumită mozaicul tutunului (fig. 103), Mayer constată că boala este contagioasă, transmițându-se de la o plantă la alta (precum gripa la oameni). Inițial Mayer a considerat că boala este provocată de un microb, adică o bacterie, însă nu a putut să depisteze nimic. Ca urmare, el a concluzionat că bacteria în cauză trebuie să fie extrem de mică.

Un an mai târziu, această ipoteză a fost verificată de un cercetător rus, D. Ivanovski, care a filtrat sucul celular extras din celulele frunzelor îmbolnăvite printr-un filtru foarte fin. După filtrare, sucul celular rămânea în continuare infecțios, boala reproducându-se destul de repede după tratarea plantelor sănătoase cu acest suc. El rămâne însă la ipoteza bacteriană a cauzei bolii, completând-o doar cu precizarea că boala ar putea fi provocată de o toxină.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 103 – Mozaicul tutunului, o boală virotică care a condus la descoperirea virusurilor după ce iniţial a fost considerată o boală bacteriană, produsă de o bacterie foarte mică (*foto autor*)

În 1897 însă problema este rezolvată de microbiologul olandez M. Beijerinck, care a descoperit că agentul infecţios aflat în sucul devenit de-acum celebru are capacitatea de a se înmulţi. Stropind plante sănătoase cu sucul filtrat în serie de foarte multe ori şi de la plante îmbolnăvite recent, a dedus că patogenul trebuie să aibă capacitatea de a se înmulţi şi de a se exprima fenotipic prin acest mozaic care se transmite uşor de la o plantă la alta.

Mai târziu şi alţi cercetători au constatat că, de fapt, patogenul se înmulţeşte numai în celulele plantelor gazdă infestate. Spre deosebire de bacterii, acest misterios agent patogen nu a putut fi cultivat pe medii de cultură în vase Petri sau alte vase de reacţie.

Pe de altă parte, mijloacele uzuale de dezinfecţie, precum alcoolul, nu au putut să-l distrugă. În concluziile studiilor sale, Beijerinck afirma că „este vorba de o particulă vie, reproductibilă mult mai mică şi mai simplu alcătuită decât bacteriile". Ipoteza sa a fost confirmată în anul 1935, deci aproape 40 de ani mai târziu, de către cercetătorul american Wendell Stanley, prin cristalizarea misterioaselor particule. Aşa a fost descoperit primul virus, virusul mozaicului tabacului (tutunului) prescurtat în limba

Scanned with OKEN Scanner

engleză TMV (tabac mosaik virus). În scurtă vreme, atât TMV cât şi alte virusruri au putut fi văzute la microscopul electronic. ■

3.3. Construcţia virusurilor

Ca dimensiuni precizăm de la început că cele mai mici virusuri au un diametru de numai 20 nm. Dacă ne raportăm la componentele celulei, putem afirma că acesta este mai mic decât un singur ribozom. Spre comparaţie, într-un cap de ac ar încăpea cu uşurinţă milioane de particule virus.

Dimensiunile virusurilor sunt variabile. La microscopul electronic numai cele mai mari virusuri sunt cu greu observabile. Descoperirea lui Stanley, conform căreia virusurile ar putea să cristalizeze, a fost extrem de incitantă şi a creat numeroase încurcături, poate şi datorită faptului că până atunci o celulă simplă nu a putut forma în mod normal cristale.

Rezultă deci că virusurile nu sunt celule. Şi, dacă nu sunt celule, se pune întrebarea, ce anume sunt ele? Există numeroase definiţii date acestora. Una dintre ele pare mai exactă, şi anume: „virusurile sunt particule infecţioase constituite numai din gene virale şi care sunt înconjurate de o membrană proteică".

Avem deci la virusuri de-a face cu două componente:

a) genele virale;

b) membrana proteică care le protejează.

Rezultă deci că virusurile dispun la rândul lor de un „genom virotic". În mod standard, putem spune că gena virală este alcătuită din cunoscutul dublu-helix elicoidal care alcătuieşte ADN-ul viral. Cel mai frecvent însă construcţia standard nu este respectată. Genomul virusului, adică totalitatea materialului genetic poate fi mai divers, şi anume:

- ADN - dubla coloană, dubla bandă cunoscută;
- ADN - dar numai o singură coloană;
- ARN - dublă coloană;
- ARN - coloană simplă, variaţia compoziţiei genetice depinde foarte mult de tipul de virus.

Cercetătorii împart, aşadar, virusurile, în:

- virusuri ADN;
- virusuri ARN, după modul în care rezultă genomul pornind de la acizii nucleici.

În amândouă cazurile genomul se prezintă cel mai frecvent ca o bandă lineară sau circulară formată din molecule ale acizilor nucleici bine ordonaţi. Cel mai mic virus deţine **4 gene** în timp ce cele mai mari ajung până la **100 gene.** ■

3.3.1. Capside şi învelişuri

Prin **capsidă** se înţelege acea manta proteică care învelește, acoperă genomul virusului. În funcţie de tipul de virus, capsida poate să fie sub forma unui bastonaş, poliedrică sau de o complexitate mai mare. Capsida este formată dintr-un număr foarte

Scanned with OKEN Scanner

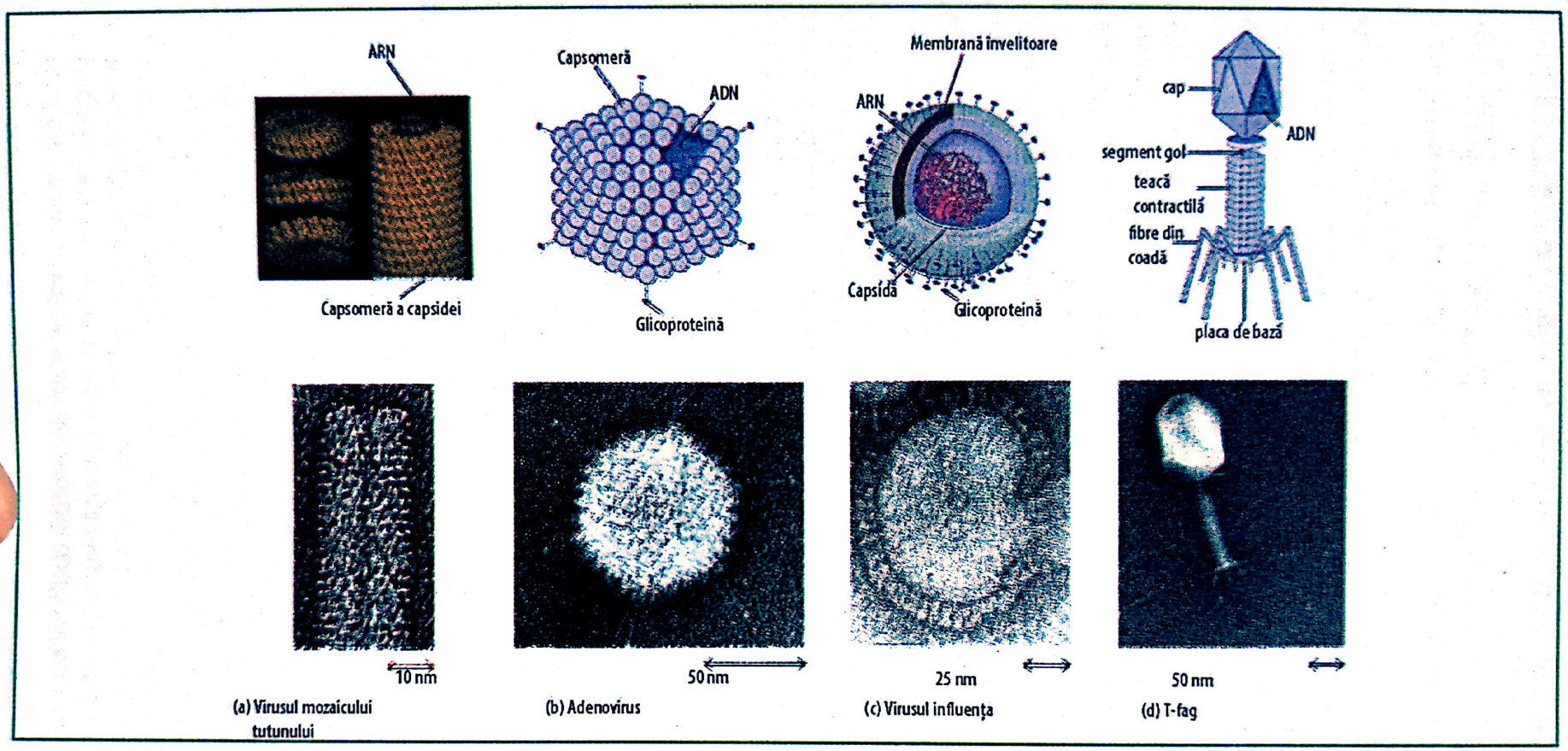


Fig. 104 – Modul de construcţie al virusurilor.
Materialul genetic al virusurilor este un lanţ de acizi nucleici, fie el ADN sau ARN, încartiruiţi într-o membrană proteică denumită capsidă. Aceasta este uneori dublată în exterior de o biomembrană. Unităţile proteice care alcătuiesc capsidele sunt denumite capsomeri. Virusurile sunt foarte diferite ca mărime şi formă, cu toate acestea ele au anumite elemente structurale comune. a) Virusul mozaicului tutunului deţine o capsidă helicoliană şi arată ca un bastonaş. b) Adenovirusul are o capsidă poliedrică formată din „spini" proteici în fiecare colţ. O parte din adenovirusuri provoacă infecţii la oameni în părţile superioare ale căilor respiratorii. c) Virusurile influenţa deţin o membrană învelitoare înglobată în glicoproteine. d) Fagii sunt virusuri care atacă bacteriile. Un virus din grupa fagilor T, cum ar fi de exemplu T4, deţine o capsidă complexă formată dintr-un cap poliedric şi o coadă. ADN-ul este „ambalat" în acest cap ciudat, iar o bucăţică de coadă care iese prin teacă injectează ADN-ul în bacterie (toate fotografiile în TEM) (*prelucrare după Campbell A.N., 2000 şi alţi autori*)

Scanned with OKEN Scanner

mare de unităţi proteice, denumite capsomere, însă numărul tipurilor de proteine din alcătuirea acestora este în mod obişnuit foarte redus.

Virusul tutunului, primul virus descoperit, are capsida sub forma stabilă de bastonaş şi în această membrană au fost descoperite peste 1000 de molecule proteice identice (fig. 104a).

Adenovirusurile, cele care atacă căile respiratorii ale animalelor, conţin în capsida lor 252 de molecule proteice şi se prezintă sub formă poliedrică având 20 de triunghiuri pe suprafaţa ei (fig. 104b).

Unele virusuri au structuri suplimentare, care le ajută atunci când infectează gazda. Este cazul **virusurilor influenţa**. Acestea şi numeroase alte virusuri care infectează animalele deţin învelişuri virale, care sunt nişte membrane care închid capsidele (fig. 104c). Aceste învelişuri sunt asemănătoare membranelor celulelor gazdă, însă suplimentar fosfolipidele şi proteinele acestora conţin şi proteine de provenienţă virală, cum ar fi, de exemplu, cele legate covalent cu hidraţi de carbon.

Dar cele mai complexe capside se găsesc ca virusurile bacteriene, cunoscute şi sub denumirea de **bacteriofagi** sau, simplu, **fagi**. Despre ei se va mai vorbi în această lucrare. Primii fagi cercetaţi au fost cele şapte virusuri având drept gazde bacteria *Escherichia coli*. În funcţie de ordinea în care au fost descoperiţi, aceştia au fost denumiţi tip 1 (T1), tip 2 (T2) .... tip 7 (T7).

Întâmplător s-a putut demonstra că fagii T cu iniţialele T2, T4 şi T6 sunt foarte asemănători din punct de vedere structural. Capsidele lor au capete icozoedrice, în care de fapt se găseşte protejat întregul material genetic. În acest cap este inclusă o coadă proteică cu fibre codale, cu ajutorul cărora fagii infectează bacteriile (fig. 104d).

Modul de infecţie este prezentat mai clar în figura 105.

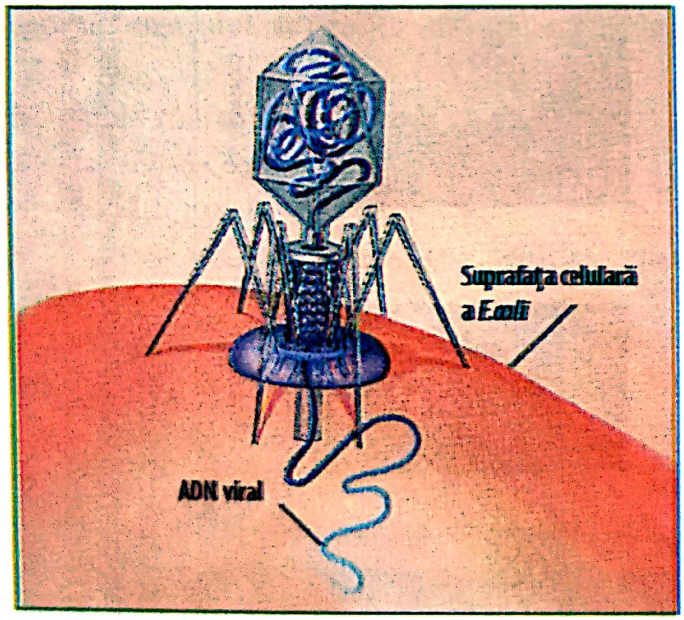


Fig. 105 – Bacteriofagul T4 de îndată ce întâlneşte bacteria *E. coli* îşi prelungeşte coada proteică prin teacă şi fibrele codale, iar ADN-ul viral este strecurat prin aceste înţepături în interiorul bacteriei pe care o infectează. Aici virusul se înmulţeşte până ce va distruge celula bacteriană. Acest procedeu va fi folosit în curând pentru distrugerea bacteriei tuberculozei, aşa cum se va vedea în unul din capitolele acestei cărţi

Scanned with OKEN Scanner

3.4. UNELE ÎNSUŞIRI IMPORTANTE ALE VIRUSURILOR

3.4.1. Virusurile nu se pot înmulți decât în celule gazdă

Virusurile sunt în mod obligatoriu paraziți intracelulari. Ei se pot înmulți numai în interiorul celulelor gazdă. Un virus izolat nu poate nici să reproducă şi nici să desfăşoare o biosinteză. Virusurile nu deţin nici o enzimă care să asigure schimbul substanţelor şi nu dispun de ribozomi sau alte componente pentru sinteza proteinelor. Virusurile nu sunt altceva decât genomuri înfăşurate în mantale proteice, care se deplasează cu uşurinţă de la o celulă gazdă la alta.

Nu toate virusurile parazitează totul, adică toate celulele. Fiecare tip de virus infectează un număr limitat de celule gazdă pe care le parazitează. Acest **număr limitat** de celule gazdă constituie **fie domeniul de parazitare, fie domeniul de găzduire** al virusurilor. Specificitatea domeniului gazdă depinde de evoluția cunoştinţelor despre tipul de virus respectiv.

Virusurile îşi recunosc celulele gazdă cu ajutorul principiului *„cheie-lacăt"* care funcţionează între proteinele de pe partea exterioară a virusului (capsida) şi receptorii specifici ai suprafeţei celulei.

Din punct de vedere al domeniului de infecţie (sau domeniului celulelor gazdă), virusurile se împart în trei categorii:

a) **Virusuri multigazdă** - adică infectează celulele mai multor specii de animale sau oameni. Exemple: virusul gripei porcine poate infecta atât porcul domestic cât şi oamenii; virusul turbării infectează o serie întreagă de mamifere, cum ar fi rozătoarele, câinii, lupii, vulpile şi, firește, oamenii.

b) **Virusuri monogazdă** - *monoorgan şi pluriorgane* - de exemplu virusul răcelii la om infectează obişnuit numai celule din căile respiratorii superioare, altele atacă simultan şi traiectul digestiv.

c) **Virusuri superspecializate.** Este citat aici virusul HIV care se leagă numai pe anumiți receptori specifici, pe anumite tipuri de celule albe. Sunt însă dintre cei mai dăunători. ■

3.4.2. Etapele unei infecții virale

e1 – Începutul infecției care constă în faptul că genomul virusului îşi procură un loc de intrare în celulă. Mecanismele pătrunderii acizilor nucleici în celula gazdă diferă de la un tip de virus la altul. Fagii T folosesc o coadă specific construită pentru a injecta în bacterii ADN-ul viral.

e2 – Odată ajuns în celula gazdă, genomul viral preia practic comanda acesteia şi îi reprogramează întreaga activitate biochimică.

e3 – Din acest moment celula gazdă începe să producă numai genomuri virale şi proteine capsidice prin procesul de înmulțire a virusului în celulă (fig. 106).

Ca un adevărat manager, ADN-ul viral foloseşte resursele celulei, inclusiv enzima ADN-polimerază, ca model de sintetizare a noului genom viral. În acest punct trebuie menționat faptul că virusurile ARN în mod obişnuit

Scanned with OKEN Scanner

folosesc propriile lor enzime cu care vin în celula gazdă pentru a-şi realiza activităţile biologice şi îndeosebi replicarea propriului lor genom. Reamintim aici că o celulă nu poate transcrie o moleculă de ARN şi că ARN-ul nu este transcriptibil.

e4 – În final, parazitul, adică virusul, transformă întreaga producţie celulară într-o producţie virală. Nucleotidele necesare sintezei acizilor nucleici sunt livrate de celula gazdă. Enzimele, ribozomii, t-ARN-ul, aminoacizii, ATP-ul şi alte componente ale celulei sunt utilizate sub *„dictatura"* genei parazitului şi transformate prin transcripţie de către ADN-ul viral în prooteine specifice virusului parazit.

e5 – Dacă toate moleculele acizilor nucleici şi cele capsomerice au fost fabricate, începe o aglomerare spontană a acestora în particulele virus, proces pe care cercetătorii l-au denumit **autoasamblare** (în engleză self-assembly). Procesul de autoasamblare a putut fi demonstrat în laborator pe TMV (tabac mosaik virus). Au fost separate ARN-urile de capside. Puse din nou în contact particulele de virus s-au reclădit aproape spontan.

De regulă, un singur virus nu poate distruge o celulă. În celulă au loc sute sau mii de cicluri de înmulţire simultan sau distanţate între ele de miimi de secundă. Ca urmare, celula este, de regulă, distrusă.

În infecţiile gripale la oameni celulele sunt iniţial deteriorate pentru ca în final să fie totuşi omorâte. Corpul încearcă eliminarea celulelor deteriorate sau moarte şi atunci apar secreţii de tot felul.

Pe de altă parte, virusurile eliberate din celulele parazitate pot cu siguranţă să infecteze alte celule, iar infecţia se propagă cu suficientă viteză. Schema ciclului de înmulţire a virusului prezentat mai sus este extrem de sumară şi nu poate surprinde variaţiile diferite existente la diferite tipuri şi celule, la animale şi plante. Vom reveni cu câteva detalii necesare.

Deoarece virusul mozaicului tutunului a fost primul descoperit, prezentăm în figura 106 ciclul de viaţă al acestuia. ■

3.4.3. Modele de cicluri de înmulţire a virusurilor

3.4.3.1. Ciclul lisic

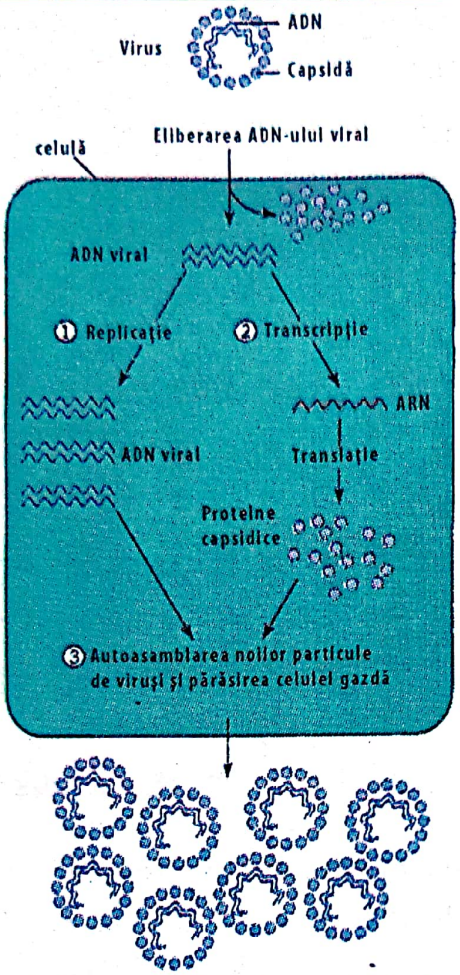
Este specific virusurilor care îşi încheie ciclul de înmulţire în celula gazdă cu moartea acesteia. Noţiunea se referă la ultimul stadiu de infecţie al celulei în care aceasta plesneşte, iar fagii „fabricaţi" se împrăştie în mediu.

Procesul se repetă, fiecare dintre aceşti fagi putând ataca o nouă celulă. În decursul a câtorva runde, o infecţie lisică eficientă poate în decurs de o oră, să distrugă o întreagă colonie de bacterii.

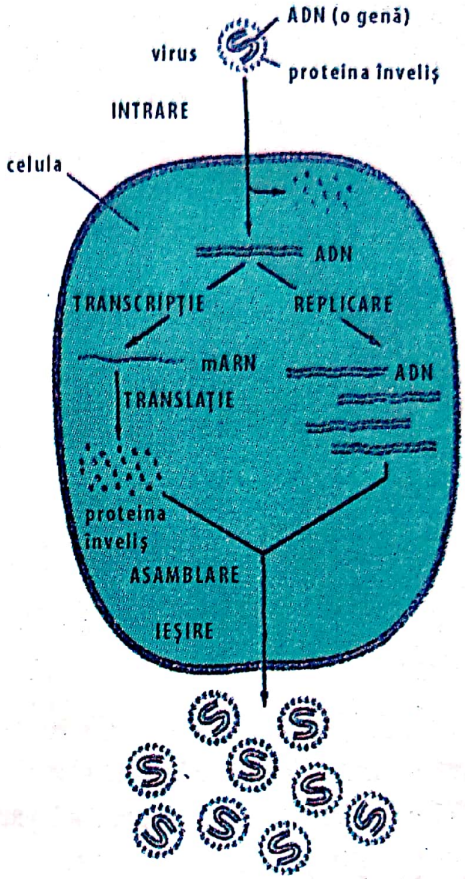
Aceste virusuri care se obţin prin înmulţire lisică sunt considerate virusuri virulente.

Fără a intra în detalii necesare acestui studiu, prezentăm în figura 107 evoluţia ciclului lisic pentru fagul virulent T4. Un ciclul lisic durează 20-30 minute.

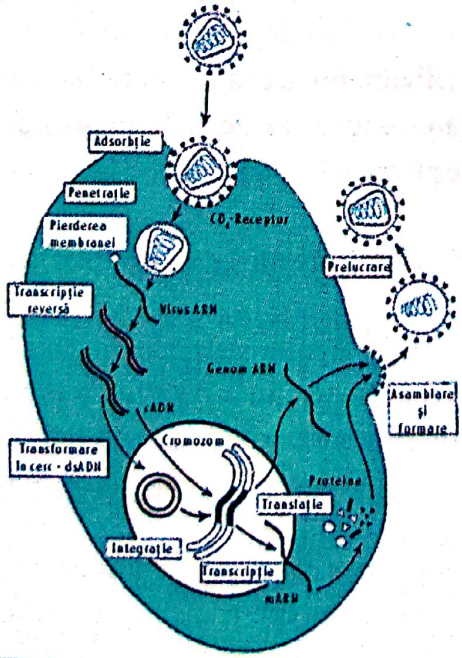
Scanned with OKEN Scanner



a) Schema simplificată a ciclului de înmulțire a unui virus în celula gazdă *(după Campbell A.N., 2002)*



b) Schema de înmulțire a VMT. Cel mai simplu ciclu din viața unui virus *(desen autor)*



c) Ciclul de înmulțire a unui retrovirus (vezi și fig. 107) *(Doerfler W., 2002)*

Fig. 106 – Metode de înmulțire a virusului

Scanned with OKEN Scanner

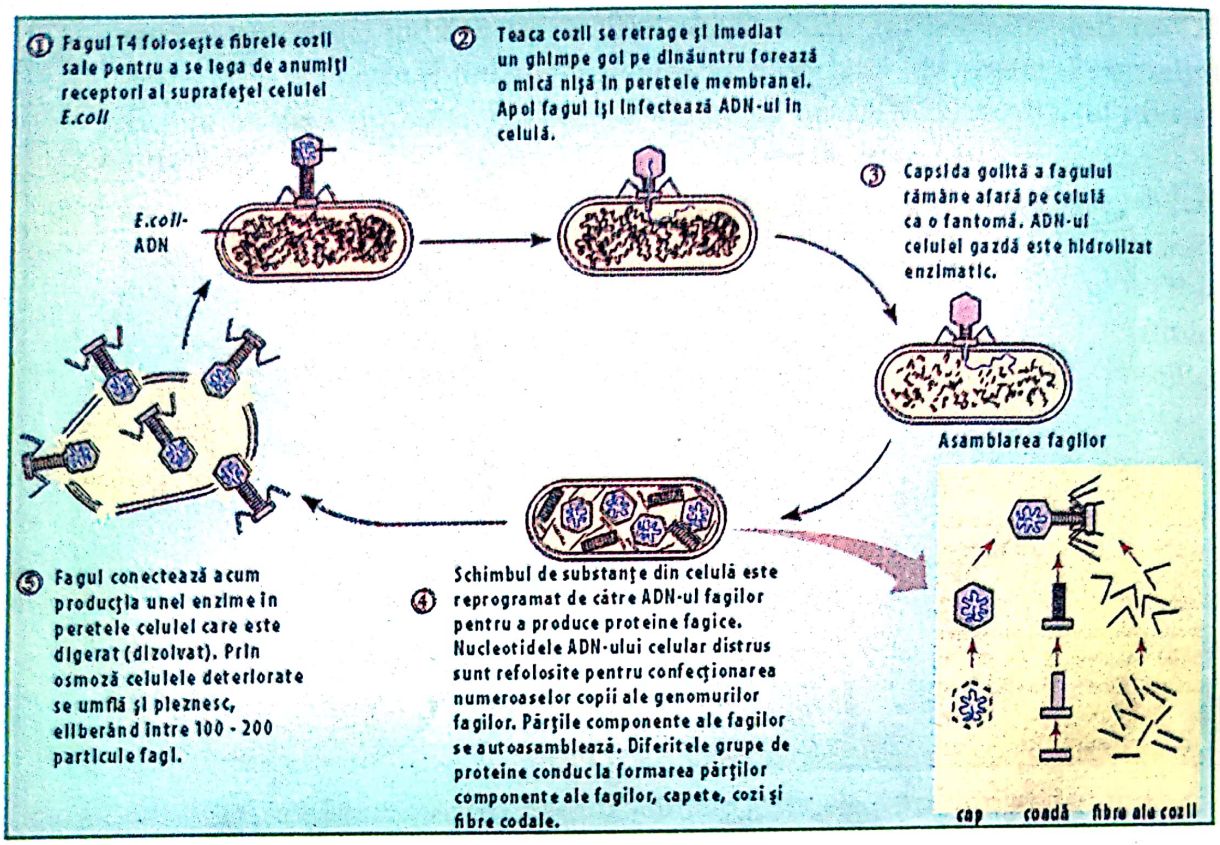


Fig. 107 – Ciclul lisic al înmulţirii virusurilor.
În acest caz este vorba de ciclul fagului T4 (*Campbell A.N., 2000*) (vezi şi fig. 106 c)

3.4.3.2. Ciclul lisogenic

Ciclul lisogenic de înmulţire a virusurilor presupune un proces biologic şi biochimic prin care se creează noul genom viral fără distrugerea celulei gazdă. Există însă şi virusuri care acceptă ambele sisteme, modele de înmulţire. Ele sunt denumite **virusuri temperate** (VT).

Pentru a putea fi comparate cele două cicluri vom prezenta în continuare un asemenea virus temperat denumit lambda (adică prescurtarea de la litera grecească λ). Îl vom mai denumi virusul λ sau fagul λ. El este asemănător cu virusul T4, cu excepţia faptului că nu deţine fibre codale.

În figura 108 se prezintă cele două cicluri de înmulţire ale acestui virus, urmare a unei infecţii asupra lui *E. coli*.

Aşa cum se observă, a apărut noţiunea de profag. Acesta reprezintă o combinaţie prin includere între genomul celulei gazdă şi cel al virusului λ. O genă a profagului codează sau codifică un „represoprotein" care în cele mai multe cazuri ţine sub control genele profagului. Aceasta este explicaţia faptului că genomul fagului este reţinut în cel bacterian liniştit, multă vreme.

Noţiunea **lisogen** ne comunică în acelaşi timp ideea că, după un anumit timp sau după un anumit număr de multiplicări, un profag se poate transforma într-un fag activ, care prin înmulţire lisică distruge celula. Fireşte că în acest caz, genomul λ părăseşte genomul bacteriei şi declanşează ciclul de înmulţire lisic.

Scanned with OKEN Scanner

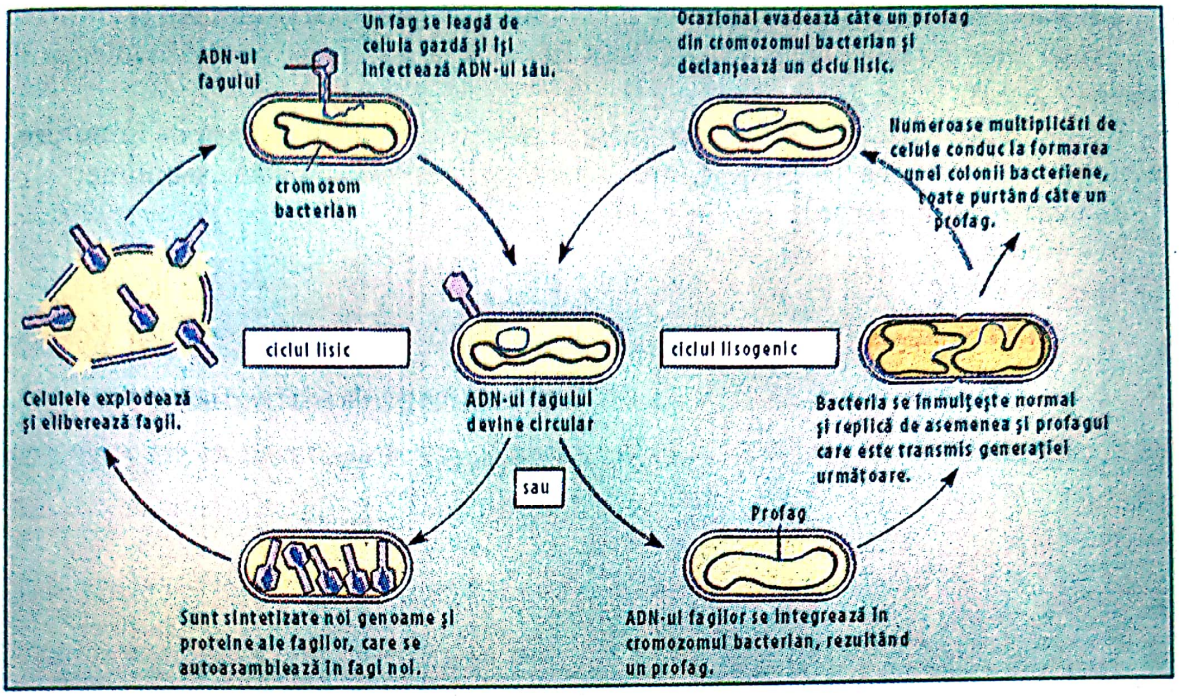


Fig. 108 – Înmulţirea combinată lisogenică şi lisică a fagilor λ.
După penetrarea în bacterie λ ADN poate fie să se integreze în cromozomul bacterian (ciclul lisogenic) sau imediat să declanşeze producţia unei mari cantităţi de urmaşi (ciclul lisic sau litic după unii autori). În cele mai multe cazuri, infecţia apucă calea lisică, însă dacă a fost ales ciclul lisogenic, fagul ajunge în genomul gazdă şi este transmis pe mai departe generaţii întregi. (*Campbell N. şi colab., 2003*)

Cauzele care creează această separare se află în mediul înconjurător, şi anume radiaţii, reziduuri chimice etc. Fenomenul, aşa cum se va cunoaşte, poate fi extrapolat şi la mamifere, inclusiv la om, unde, aşa cum se va vedea, endovirusurile calme, liniştite, pot fi reactivate de diferiţi factori de mediu şi pot produce maladii foarte periculoase.

Pe de altă parte, alături de gena represoproteică, în perioada ciclului lisogenic se exprimă, se manifestă şi o altă genă a profagului, iar aceasta ar conduce la modificarea fenotipului bacteriei gazdă.

Acest fenomen este de o mare importanţă pentru medicină. Spre exemplu, agenţii patogeni ai difteriei, botulinismului sau scarlatinei nu ar fi deloc activi dacă aceştia nu ar deţine o genă profag care să conducă la fabricarea toxinelor de către bacterii. ■

3.4.3.3. Diversitatea infecţiilor virale şi a mecanismelor de replicaţie la animale

Această problemă este cu atât mai importantă cu cât ştim că este prezentă în relaţia dintre virusuri şi mamifere, inclusiv omul. Este aproape imposibil ca vreunul dintre noi să nu fi avut vreo infecţie fie ea şi simplă, cum ar fi varicela sau vărsatul de vânt, gripă sau pur şi simplu o răceală.

În tabelul 109 sunt prezentate câteva categorii de virusuri prezente în relaţia lor cu animalele, clasificate în funcţie de nucleotide (a se vedea şi anexele 12 şi 13).

Scanned with OKEN Scanner

Ca toate virusurile, acestea sunt agenţi ai unor boli prezente la oameni şi animale din grupa unor paraziţi obligatoriu intracelulari, care se înmulţesc numai în interiorul celulelor gazdă.

La mamifere, virusurile prezintă o mare varietate a schemei de bază de înmulţire, în funcţie de alcătuirea lor. Două dintre variante au fost mai cercetate, şi anume:

a) a virusurilor cu manta, înveliş viral;

b) a virusurilor cu genom ARN.

Între ele există şi mai multe combinaţii posibile.

Tabelul 109

Clasificarea virusurilor care atacă la animale, în funcţie de acizii nucleici

Clasa de viruşi [1]	Bolile pe care le provoacă
I d.c. ADN[2] a) Papora virus	Papiloame (negi la oameni, cancere ale colului utelin), polioame (tumori la anumite animale)
b) Adenovirus	Infecţii ale căilor respiratorii şi unele tumori obţinute la unele animale
c) Herpes virus sau virusul herpes	Herpes simplex I (pustule, băşici ale pielii) Herpes simplex II (pustule genitale) Herpes simplex III (varicelă, Zona Zoster) Virusul Epstein-Barr (mononucleoză, Limfomul Burkitt)
d) Virusul vărsatului, pustular	Varicelă (vărsat de vânt), vărsat de vânt la vaci
II s.c. Parvovirusuri[2]	Gastroenterite: pentru înmulţirea lor, parvavirusurile, în majoritate necesită şi o coinfecţie cu adenovirusuri
III d.c. Reovirusuri	Virusuri care provoacă diaree.
IV s.c. ARN pe post de mARN Virusul Picorna	Poliovirus (virusul strănutului, al răcelilor) Enterovirusuri (virusuri ale intestinului gros)
Virusul Toga	Inflamaţii (înroşiri) - febra galbenă - encefalite
V s.c. ARN ca matriţe pentru sinteza mARN – Rabdovirus – Paramixovirus – Ortomixovirus	– turbarea (virusul rabic) – pătare, oreion – virusuri influenţa - cei care provoacă gripe
VI s.c. ARN ca matrice pentru sinteza ADN-retrovirusuri	ARN - virusuri tumorale (leucemie) HIV - virusul SIDA

3.4.3.4. Înmulţirea virusurilor cu înveliş (manta)

S-a mai afirmat deja că diferite virusuri care activează diferite boli la animale sunt „îmbrăcate" la exterior cu o membrană denumită şi manta virală şi care înconjoară virusul pe deasupra capsidei. Spre deosebire de virusul T4, în acest caz, membrana este aceea care ajută parazitul să pătrundă în celulă (fig. 110). Mantaua este construită din două biomembrane, adică 2 straturi lipidice (grăsimi) asemănătoare unei membrane plasmatice umplută în exterior cu glicoproteine. Ciclul din figura 110 se desfăşoară în 9 etape succesive, dar nu lipsesc nici întrepătrunderile dintre etape.

[1] Subclasele sunt determinate de structura capsidelor şi de prezenţa sau absenţa mantalei

[2] d.c. = dublu coloană; s.c. = coloană simplă

Scanned with OKEN Scanner

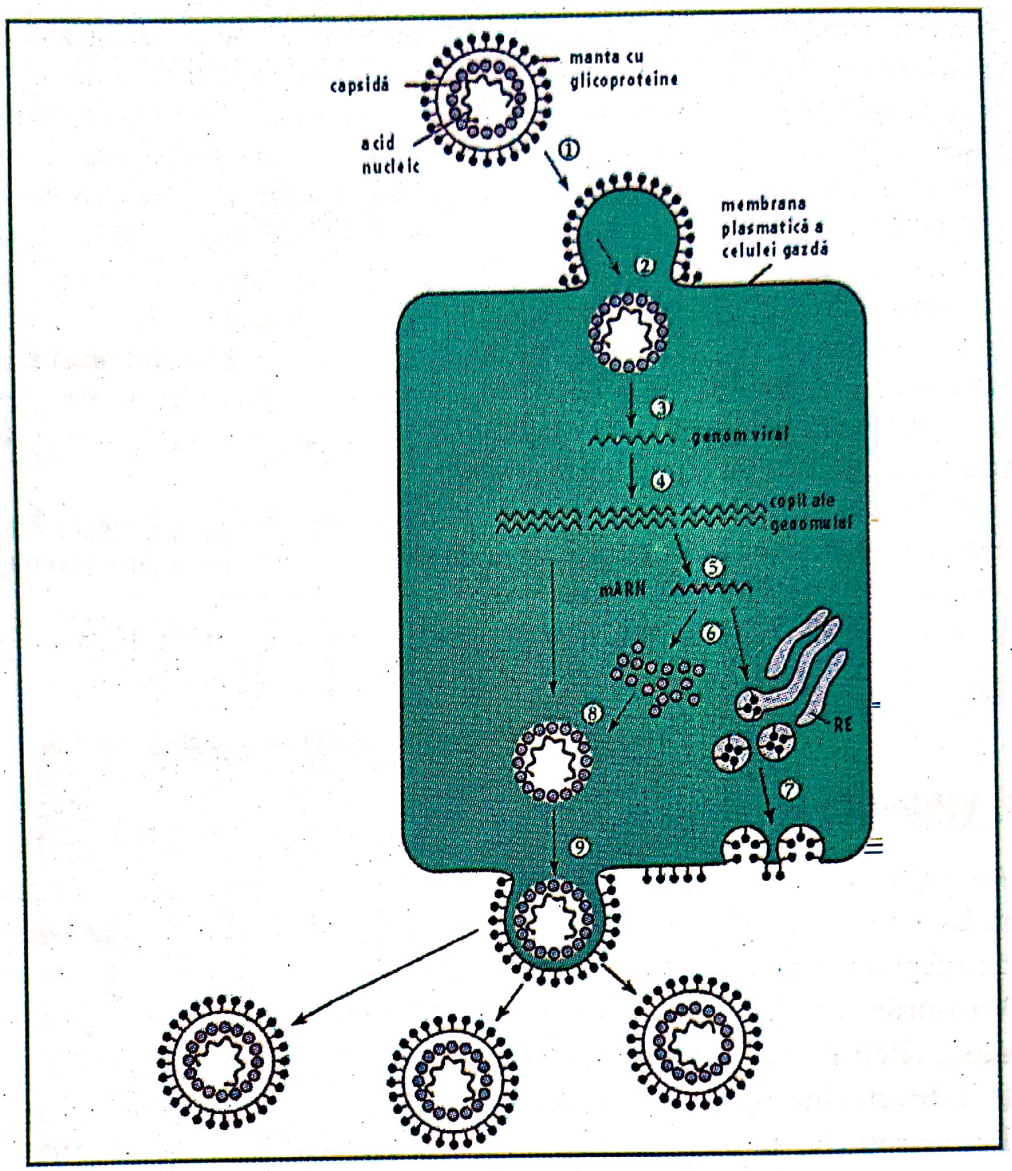


Fig. 110 – Ciclul de înmulțire a unui virus cu manta

1. Moleculele de glicoproteine prezente pe mantaua virală recunosc anumite molecule receptoare prezente pe suprafața celulei gazdă și se leagă de acestea. Mantaua virală se topește în membrana plasmidică a celulei.
2. Capsida și genomul viral pătrund în interiorul celulei.
3. Enzime celulare specifice înlătură capsida.
4. Genomul viral este replicat.
5. Copiile sunt transcrise în mARN.
6. mARN-ul este translatat în proteinele capsidice ca și în glicoproteinele caracteristice mantalei virale.
7. Veziculii transportă glicoproteinele spre membrana celulei.
8. Capsida reconstruiește genomul viral.
9. Virusul înmugurește părăsind celula. Mantaua sa deține iarăși licoproteine care ajută să se separe de plasmă membrana celulei.

Poate ar trebui să precizăm că parazitul folosește o parte din mașinăria celulei gazdă cum ar fi reticulul endoplasmatic, pentru a-și sintetiza propriile proteine membranice. După părăsirea celulei, noile virusuri pot infecta noi celule după același model.

Scanned with OKEN Scanner

Mai este de reţinut faptul că ciclul reproductiv nu distruge celula gazdă, ci se foloseşte de aparatura sa, ceea ce îl diferenţiază de ciclul lisic (litic) al fagilor.

Există însă o serie de virusuri a căror manta nu provine din membrana plasmatică a gazdei.

Spre exemplu, mantaua virusului Herpes se formează şi se desprinde din membrana nucleară a gazdei. De fapt, genomul acestui virus deţine o dublă coloană ADN şi se înmulţeşte în interiorul nucleului. Şi în acest caz pentru replicare şi transcripţia ADN-ului său este folosită o enzimă combinată virus x celulă.

În timpul şederii sale în nucleu, ADN-ul virusului Herpes se integrează asemănător unui profag ca **provirus** în genom. De aceea, o infecţie cu virusul Herpes, inclusiv în cazul pustulelor pielii sau a celor genitale nu mai poate fi retrasă. Aceasta înseamnă că boala se manifestă pe durata întregii vieţi.

Din fericire, în foarte numeroase cazuri imunosistemul ţine această boală foarte bine în **şah**. În perioada dintre preluarea virusului şi infecţia în sine (boala), virusul rămâne latent în nucleul celulei gazdă.

Din când în când se întâmplă însă ca factori de stres de natură fizică sau psihică să reactiveze virusul latent. Acesta, devenit activ se replică (se înmulţeşte) şi conduce la apariţia simptomelor specifice ale infecţiei. ■

3.5. VIRUSURI ARN

Am arătat deja că virusurile prezente la animale dispun de o multitudine de genomuri. De o mare importanţă sunt însă virusurile ARN şi aceasta pentru că numeroşi bacteriofagi şi virusurile plantelor aparţin clasei ARN-virusuri.

Virusurile ARN cu cel mai complicat ciclu de reproducţie sunt denumite **retrovirusurii**. „Retro" - provine din limba latină şi înseamnă „înapoi" şi se referă cu siguranţă la direcţia inversă a fluxului informaţional genetic la aceste virusuri.

Retrovirusurile deţin un singur fel de enzimă denumită **transcriptază reversă**. Această enzimă este în măsură să transforme ARN-ul în ADN, adică invers decât se întâmplă în ciclurile aplicării genomurilor celulare. Noul ADN format se integrează apoi ca provirus într-un cromozom al nucleului unei celule animale.

Polimeraza ARN a celulei gazdă transcrie în continuare ADN-ul viral în molecula ARN, aceasta din urmă putând funcţiona ca mARN pentru sinteza proteinei virale şi pentru formarea noilor genomuri în descendenţe. Ele pot apoi să fie eliberate din celule.

Un retrovirus de foarte mare importanţă în finalul mileniului II şi începutul mileniului III este numit HIV (Human Immunodeficiency Virus). Acest virus este agentul sindromului imunodeficitar, cunoscut în limba română ca SIDA sau în limba engleză AIDS (Acquired Immunodeficiency Syndrome). Alcătuirea şi ciclul de înmulţire al acestui virus sunt prezentate în figurile 111 şi 112 şi le vom comenta, având în vedere marea sa importanţă.

Înainte de toate, trebuie însă să remarcăm că, pe fond, comportamentul virusului odată pătruns în celula gazdă este unul dictatorial, perfid şi eficient, comportamente biologice şi biochimice care se aseamănă extrem de mult cu cele sociale aparţinând societăţii umane.

Scanned with OKEN Scanner

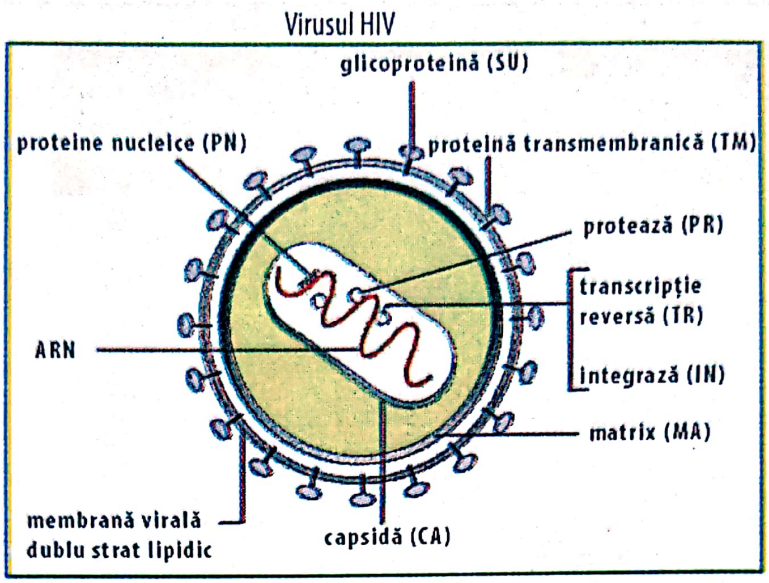


Fig. 111a – Alcătuirea schematică a virusului HIV, agentul SIDA
Glicoproteinele mantalei oferă virusului posibilitatea de a se fixa pe receptorii specifici ai suprafeței anumitor celule albe ale sângelui. Virusul deține 2 molecule ARN identice, dar necomplementare

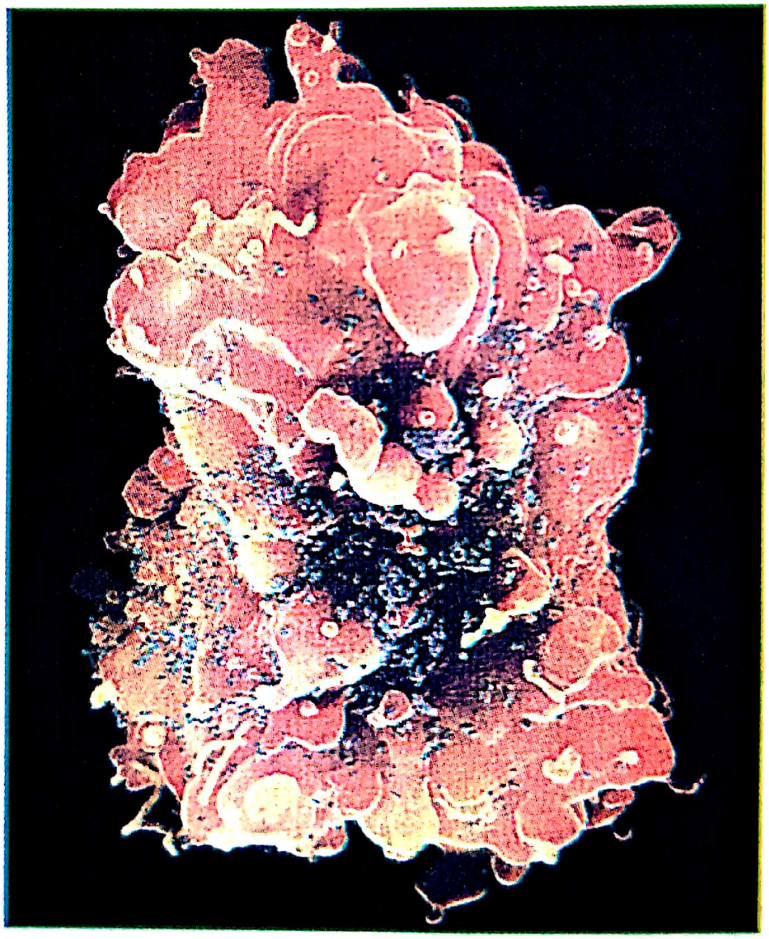


Fig. 111b – O celulă T (celulă cunoscută imunității) infectată cu virusul HIV.
Virusurile (albastru) se leagă în permanență de suprafața celulei T (colorat oranj REM). Celula moare, dar în prealabil produce numeroase copii ale virusului. Virusul a fost descoperit în SUA în 1983 și încă și astăzi este în măsură să provoace o mortalitate de 100% la oameni. Moartea este cauzată nu de virusul în sine, ci de distrugerea sistemului imunitar și proliferarea altor boli care, nestăpânite, provoacă moartea (*Revista Focus*)

Scanned with OKEN Scanner

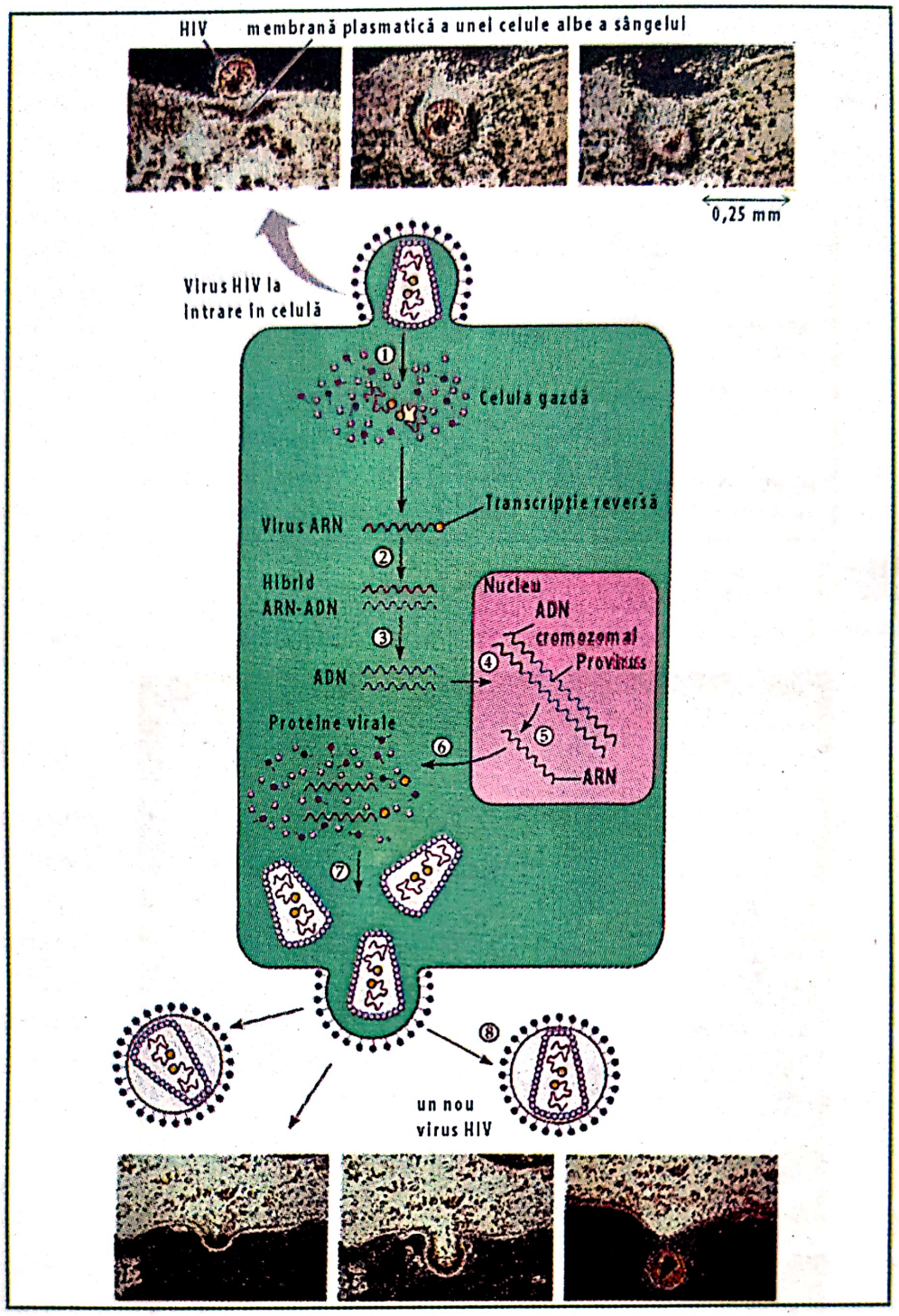


Fig. 112a – Modele de înmulțire a unor retrovirusuri periculoase – ciclul de înmulțire al virusului HIV:

1. Genomul virusului pătrunde în celula gazdă, dacă acesta a fuzionat cu membrana plasmatică. Imediat proteinele capsidice sunt înlăturate.
2. Transcripția inversă catalizează sinteza unui ARN-premergător al virusului, complementar ADN-ului.
3. Noua coloană ADN servește ca model matrice pentru sinteza unei coloane suplimentare ADN.
4. Rezultă un ADN bicoloană care este un provirus și care este înglobat în genomul gazdei.
5. Genele provirale vor fi transcrise în mARN.
6. Acestea sunt apoi translatate în citoplasmă în proteinele HIV. ARN-ul transcris de provirus formează un nou genom pentru următoarea generație a virusului.
7. Urmează reconstrucția capsidei care înconjoară și apără genomul.
8. Noile virusuri înmuguresc și părăsesc celula gazdă

(*prelucrare după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

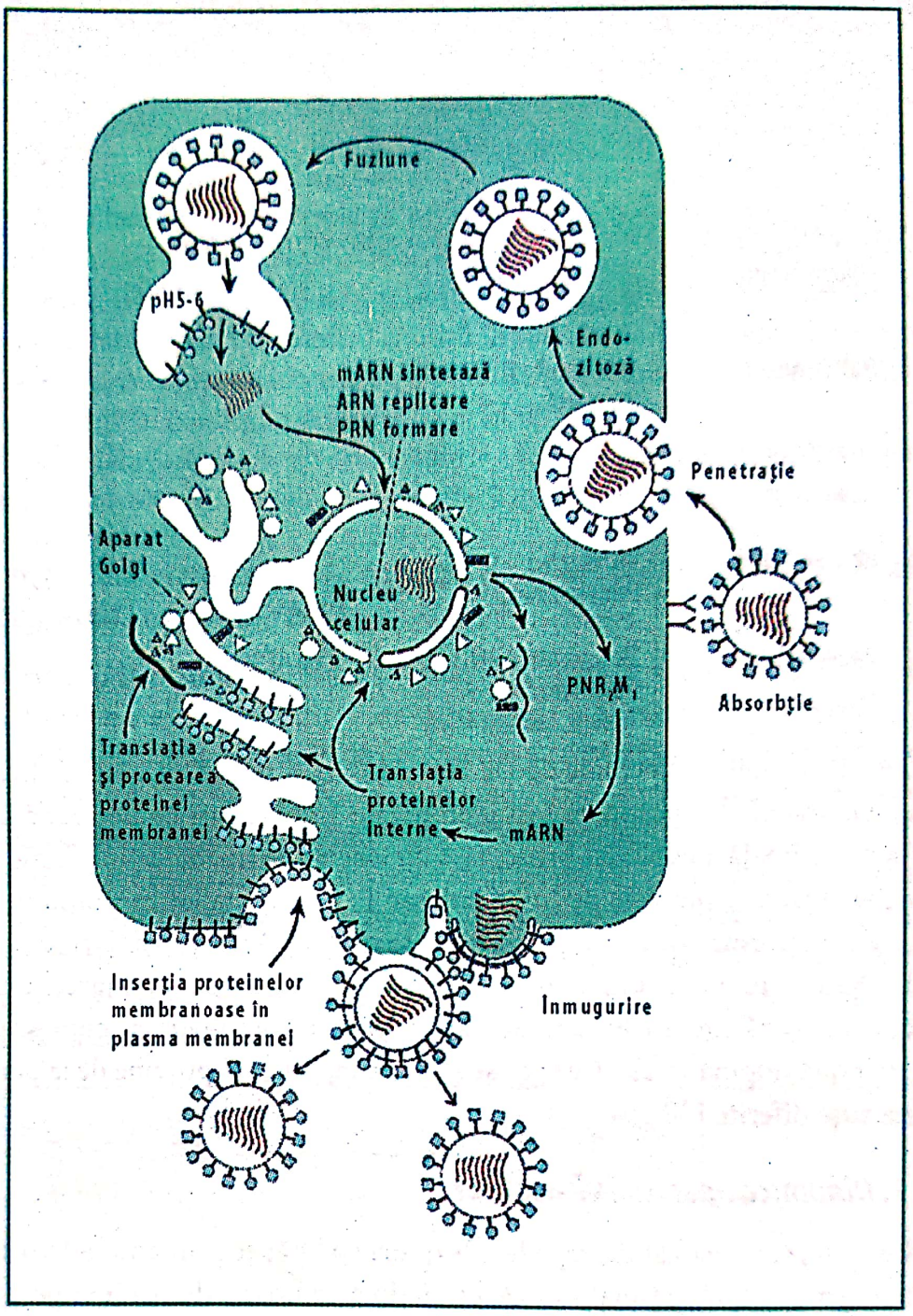


Fig. 112b – Modele de înmulțire a unor retrovirusuri periculoase – ciclul de înmulțire al virusului Influenza

Deși acest comentariu nu face obiectul acestui material, n-am putut să nu remarcăm asemănarea dintre comportamentul dictatorial al ocupantului celulei, politica diferențiată și perfidă de a-i folosi resursele, ingeniozitate care se ascunde în genomul gazdei până la proxima ocazie când factori de stres, adică de slăbiciune ai gazdei îl reactivează pentru a trece la atac. Distrugerea rapidă sau lentă, după caz, a celulei gazdă își găsește echivalentul în istoria omenirii în relațiile interumane la scară mai mică sau mai mare.

Scanned with OKEN Scanner

În partea superioară a figurii 112a se observă trei fotografii la microscopul electronic (TEM) în care este surprins un virus HIV în momentul în care penetrează în celula gazdă. În partea de jos a aceleiași figuri, o serie de alte trei fotografii care redau fenomenul de înmugurire și de desprindere a particulei virale dintr-o celulă albă a sângelui uman.

Principalele enzime asociate virusurilor sunt următoarele:

- Influenza virus
  - ARN polimerază
  - Endonuclează
- Retrovirusuri
  - Transcriptază reversă
  - Integrază
  - Protează
- Adenovirus
  - Protează
- Virusuri herpes
  - Protează
  - Protein-kinază
- Virusuri Poken
  - Polimerază ARN - dependentă de ADN
  - Polimerază poli A
  - Topoisomerază ADN

Cercetări recente, efectuate de Dr. Harold Burger de la Colegiul Medical Albany - SUA au arătat că de curând au fost identificate 3 noi cazuri de persoane infectate cu HIV a căror boală a explodat brusc, fără cunoscuta perioadă de incubație și fără nici o reacție la medicamentele de întârziere sau la vaccinul aflat în studiu pe mai mulți voluntari. Se presupune că această infecție se datorează unei asimilări (uniuni) a două tulpini HIV care, prin combinare, a dat naștere unui virus ultraagresiv. Momentan, biologii studiază modul în care are loc această recombinare și cum se înmulțește această nouă tulpină virală. Ceea ce se știe este faptul că el provine de la persoane care poartă suşe diferite HIV. ■

3.5.1. Dinamica apariției virusurilor

S-a observat deja cât de repede și exploziv a apărut prin anii '80 virusul HIV și boala mortală SIDA, căreia i-au căzut victimă milioane de oameni pe pământ. Nu mult după aceea, începând cu 1993, zeci de americani din statele sudice au murit datorită infecției cu **virusul Hanta,** numită de mass-media ca o „nouă boală". În 1995, epidemiologii au fost de-a dreptul șocați când în Zair a izbucnit o nouă infecție mortală cauzată de **virusul Ebola.**

Virusurile de tip Influenza creează în fiecare an noi forme, ca urmare a unei selecții a formelor rezistente la vaccinurile uzuale și care provoacă numeroase pagube materiale la milioane de oameni ce nu pot merge la muncă și la școală, fiind practic obligați să rămână în pat datorită acestor gripe (fig. 112 b).

Se pune, firesc, întrebarea: **de unde** apar **aceste noi virusuri?** Cercetările au concluzionat că la apariția îmbolnăvirilor virale bruște participă trei procese:

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

REȚINEȚI!

Un virus consacrat poate să se modifice prin evoluție și poate provoca îmbolnăvirea populației, chiar dacă aceasta a căpătat imunitate împotriva virusului de bază.

Anual sau la fiecare 2 ani epidemii de gripă „incendiare" sunt provocate de virusuri care aparțin unor noi surse virale ca urmare a unor noi modificări, noi evoluții genetice. Noul „model" se diferențiază suficient de mult de virusul anului precedent, ca pentru început, imunosistemul uman să nu-l contracareze, firește o perioadă de timp suficient de lungă, până se creează și intră în funcție un nou sistem de apărare a corpului. De aceea, vaccinurile efectuate cu produsele biologice active anul trecut nu mai servesc la nimic în condițiile infecției cu noul virus.

Între două epidemii de gripă, virusul evolutiv a fost găzduit de alte animale-gazdă, îndeosebi rațele, sau alte păsări sau animale specifice de apă. ■

3.5.2. *Un virus consacrat se poate extinde de la un organism gazdă la altul, aparținând la specii diferite*

Virusul variolei la maimuțe creează pustule specifice (de vărsat) pe pielea animalelor gazdă. Boala s-a extins în anii '50 de la maimuțele africane la cele asiatice, ocazionat de faptul că maimuțe din ambele continente au fost găzduite împreună în cuști înguste. Acest lucru s-a întâmplat atunci când laboratoarele mari ale lumii au început testarea pe maimuțe a unor noi vaccinuri antipoliomielitice.

Organizația Mondială a Sănătății a demonstrat faptul că pentru prima dată variola a trecut de la maimuțe la oameni în satele de pădure din Zair (Africa Centrală) în anii '70. Este însă foarte probabil ca oamenii să nu fi primit virusul direct de la maimuțe, ci prin intermediul cornutelor sau a altor animale de casă care au fost purtătoare de virus fără însă ca acesta să se manifeste simptomatic.

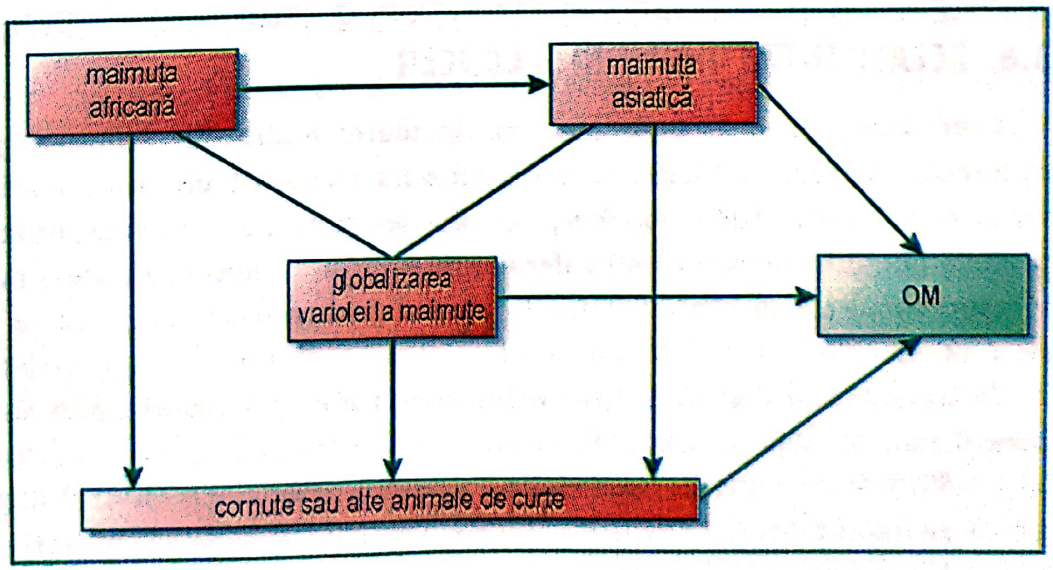


Fig. 113 – Apariția variolei la om în Africa Centrală și apoi în întreaga lume (*Berca M., 2004*)

3.5.3. Un virus consacrat se poate extinde rapid pornind de la populații reduse

Virusul Hanta care în 1973 a făcut mare vâlvă în America, nu era deloc un virus nou, nici măcar pentru oameni. Un rozător mic, șoarecele cerb (*Peromyscus maniculatus*) s-a constatat a fi rezervorul acestui virus și este foarte probabil că infecțiile ocazionale la oamenii din sud-vestul SUA să fi fost acolo de sute de ani. Explozia infecțională din anul 1993 s-a datorat unui an climatic foarte umed și bogat în furaje pentru șoareci. În consecință, a avut loc o înmulțire, de asemenea, explozivă a șoarecilor. Infecția oamenilor cu virusul Hanta se face prin inhalarea prafului infectat cu urina și fecalele șoarecilor.

Povestea SIDA stă însă cu totul altfel. Decenii întregi boala a rămas necunoscută și neremarcată, înainte de a evolua cu brutalitate. În cazul HIV, factorii sociali și cei de globalizare, cum ar fi călătoriile la distanță, transfuziile de sânge, comportamente sexuale nepotrivite, injecțiile cu droguri, au făcut ca o boală atât de rară ca SIDA să evolueze planetar și la cote înalte.

Urmare a acestei analize am putea spune că „noile apariții virale" nu sunt deloc noi și că virusuri consacrate și-au mărit numărul gazdelor prin evoluție, prin infecțiile unor noi organisme (specii noi) sau prin expansiune de la populații mici la populații din ce în ce mai mari până s-a ajuns la scară planetară.

Modificările climatice, fie de sorginte naturală, fie antropică, s-au corelat direct cu viteza de expansiune a virusurilor, care a condus, firește, la dezvoltarea unor noi boli.

În competiția interspecifică virusuri - oameni, deși pare ciudat, un mare rol l-a jucat și îl joacă distrugerea pădurilor pentru a câștiga teren pentru agricultură. Acest lucru a condus la modificări ale relațiilor ecologice, care au făcut ca oamenii să vină mult mai frecvent în contact cu animalele, virusurile găzduite ascuns la animale au putut mai ușor infecta oamenii. ■

3.6. RELAȚII ÎNTRE VIRUSURI ȘI CANCER

Cercetătorii în virusologie încearcă de foarte mulți ani rezolvarea problemei cancerului la animale. Virusurile tumorale sunt reprezentanți ai retrovirusurilor, ai virusurilor Papora, Adeno sau Herpes. Folosirea culturilor de celule animale a făcut posibilă înmulțirea virusurilor în afara organismelor. Celulele de cultură infectate cu virusuri tumorale au căpătat statutul de **celule canceroase** pentru că se înmulțesc necontrolat.

În anumite cazuri există suficiente informații cum că virusurile sunt responsabile pentru anumite boli canceroase la oameni:

- Virusul hepatitei B - constituie cu mare probabilitate factorul important al apariției cancerului hepatic la indivizii bolnavi de hepatită cronică.
- Virusul Epstein-Bar, agentul bolilor de tip Herpes, cel care conduce la infecțiile mononucleoze este și cel mai responsabil de anumite tipuri de cancer într-o mare parte a Africii. Boala începe prin atacarea limfonului Burkitt.

Scanned with OKEN Scanner

- Virusul Papillom (din grupa Paporavirus) are o legătură indiscutabilă cu apariţia cancerului uterin la femei.
- În cazul retrovirusurilor, unul dintre ele şi anume HTLV -1 provoacă o formă de leucemie la adulţi. Numeroase virusuri tumorale transformă fondul genetic al celulei prin integrarea acizilor nucleici virali în ADN-ul celulei gazdă.

Cercetătorii au identificat o serie întreagă de gene virale care pot **induce direct „transformarea celulelor".**

Despre unele din aceste gene s-a mai scris în acest material. Ele au fost denumite **oncogene**, iar apariţia lor nu se limitează numai la virusurile şi celulele tumorale. Ele sunt prezente în celulele normale la numeroase feluri de organisme.

- Oncogenele identificate până în prezent par a fi responsabile de codificarea (codarea) factorilor celulari de creştere sau a proteinelor care participă la regularizarea creşterii (spre exemplu receptorii pentru factorii de creştere).
- În anumite cazuri, oncogena este absentă în virusul tumoral. În acest caz, celula gazdă este transformată prin cuplarea sau întărirea capacităţii de expresie a oncogenei specifice celulei. Prin diverse mecanisme de schimb aproape întotdeauna un virus al cancerului poate fi eliminat. **Cu toate acestea, există informaţii foarte bine verificate că oncogena este în mod obişnuit activată numai pentru a determina degradarea în celula canceroasă a celulei gazdă.**

Pe de altă parte, există informaţii la fel de bine verificate că infecţiile cu cele mai numeroase virusuri - agenţi cancerogi - se pot declanşa numai în combinaţii cu alte evenimente care pot induce sau favoriza cancerul, cum ar fi, de exemplu, cu influenţa unor chimicale mutagene. Acest lucru a condus la constatarea că, agenţi nevirali ai inducerii cancerului (carcinogenele) devin activi în inducerea cancerului prin stimularea oncogenelor în activitatea celulei. ■

3.7. VIRUSURILE ÎN PLANTE ŞI EFECTE ASUPRA PRODUCŢIILOR AGRICOLE

Cel puţin conform cercetărilor de până în prezent, virusurile plantelor conduc la creştere piticită şi reducerea semnificativă a recoltelor. Virusurile plantelor sunt virusuri ARN. Majoritatea, inclusiv virusul mozaicului tutunului, au capsidă în formă de bastonaş pe care proteinele sunt ordonate spiralic (fig. 114).

Există două căi prin care plantele se îmbolnăvesc, iar boala virotică se extinde, şi anume:

a) **Transmisia pe orizontală** - planta este infectată de către o sursă externă. În mod normal, plantele se apără de infecţie printr-o protecţie mecanică generată de epiderma celulelor. Pentru ca infecţia să pătrundă în plantă, este necesară o rănire a plantelor şi crearea unor portiţe de intrare a virusurilor. Acest lucru la plante este cauzat de vânt, geruri, răniri sau atac de insecte. De fapt, insectele reprezintă un pericol dublu, şi anume:
   - transmit virusul de la o plantă la alta;
   - cauzează pagube uriaşe plantelor.

Scanned with OKEN Scanner

Agricultorii şi grădinarii pot fi ei înşişi transmiţători de virusuri dacă în mod inconştient folosesc aceleaşi unelte la plantele virusate şi la cele sănătoase (foarfece, ferăstraie etc.).

b) **Transmisia pe verticală** se realizează prin transmiterea de la părinţi la descendenţi a virusului, care fireşte este deja în interiorul genomului, atât a celulelor somatice cât şi a celor reproductive. Înmulţirea asexuată este foarte potrivită acestui model de infecţie. Ea se realizează prin butaşi şi prin altoit. Înmulţirea sexuată conduce la obţinerea seminţelor care conţin şi ele ARN-ul viral şi din ele prin replicare se va obţine un număr important de plante virusate.

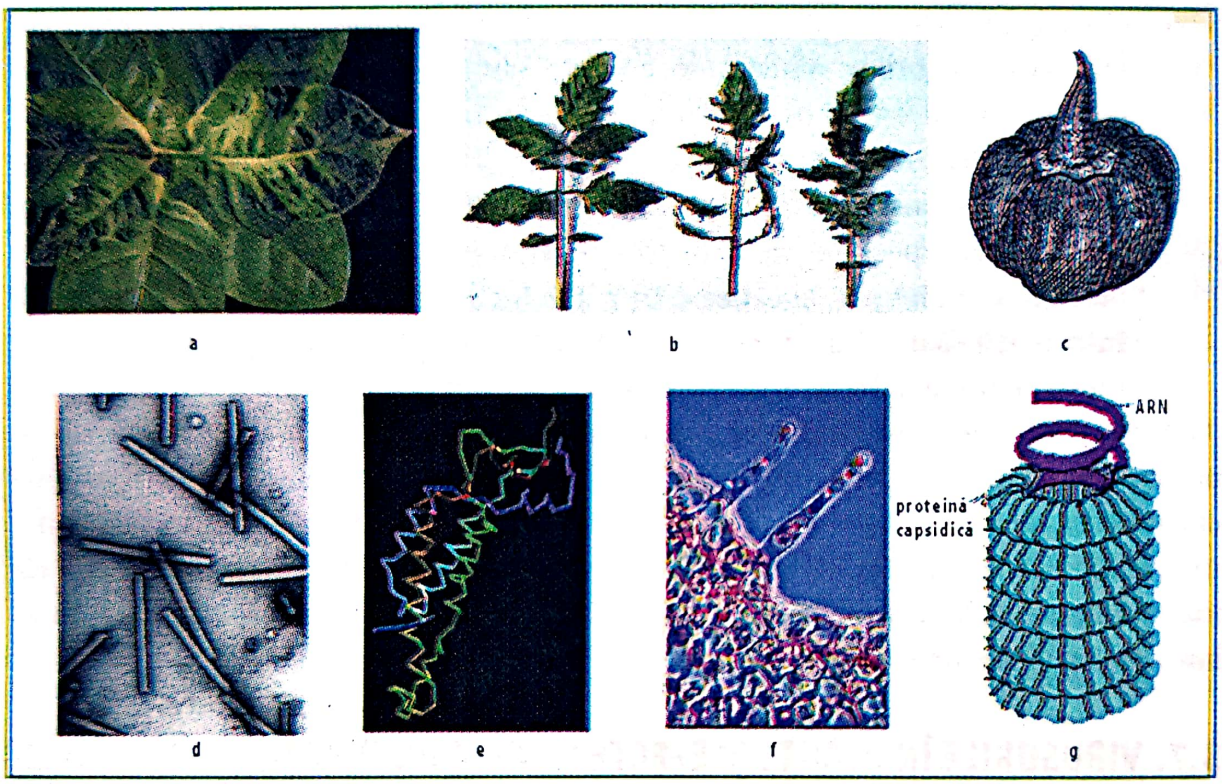


Fig. 114 – Infecţii virale la plante (virusul mozaicului tutunului TMV)
a) Infecţie pe tutun - plantele cresc pitice sub formă de tufe şi nu produc.
b) Atac asupra tomatelor - simptome asemănătoare.
c) Simptome pe fructele de dovleac.
d) Virusurile sunt sub formă de bastonaşe.
e) ARN-ul viral.
f) Particule de virus.
g) Capsida virală cu proteinele aşezate spiralic (*surse publice diferite – Internet şi fotografii proprii*)

De îndată ce un virus a pătruns într-o plantă şi a început să se înmulţească, particulele virale se pot întinde suficient de repede în întreaga plantă. Plasmodesmele şi bastonaşele citoplasmice (vezi fig. 114 d şi f) pot penetra uşor pereţii celulelor şi pot contamina celulele de la una la alta.

Foarte important de reţinut este faptul că specialiştii în protecţia plantelor împreună cu agrobiologii, de la descoperirea TMV şi până în prezent, adică cu mult peste un secol, n-au reuşit să găsească nici o terapie pentru combaterea bolilor virale.

Scanned with OKEN Scanner

Tocmai de aceea, în acest domeniu de activitate cercetările au trebuit să fie redirijate spre metode de reducere a contactării de către plante a virusului şi de reducere a transmiterii virusului. Geneticienii şi amelioratorii încearcă în paralel obţinerea unor plante rezistente la virusuri, cercetări care dacă vor fi pozitive vor încheia acest capitol extrem de disputat. ■

3.8. ALTE MODELE DE VIRUSURI, VIROIDE ŞI PRIONE, MAI SIMPLU CONSTRUITE DECÂT VIRUSURILE CONSACRATE

Cu toate că virusurile au fost considerate cei mai simpli şi mai mici agenţi patogeni ai plantelor, iată că cercetările ultimilor ani vin şi ne propun existenţa şi a altor particule patogene mai simple.

Viroidele sunt molecule mici, dezgolite, formate din ARN şi care în lungime nu depăşesc 100 nucleotide. Frecvent aceste molecule ARN provoacă deranjamente ale schimbului de substanţe în plante şi conduc la o creştere grăbită şi piticită. Statisticienii în biologie consemnează că un asemenea viroid a condus nu cu multă vreme în urmă la moartea a peste **1 milion de palmieri - cocos în Filipine.**

Există, de asemenea, suficiente informaţii cum că viroidele (se mai numesc şi viroizi) pătrund în celule. Ele se înrudesc cu genele normale ale anumitor eucariote şi care aparţin grupării rARN a genelor. Această afirmaţie a fost demonstrată de faptul că secvenţa nucleotidică a unui viroid-ARN este identică cu secvenţa unui intron al acestei gene, intron care poate cataliza excitarea propriului său ARN. Este foarte posibil ca viroizii să fie „introni eliminaţi" din genom.

Se pare că viroizii creează erori în activitatea regulată a genelor, care se transmit în fenotipuri sub forma unor boli care provoacă plante pitice şi îndesate. Viroidele sunt acizi nucleici care au o capacitate redusă de autoreplicare, iar transmiterea de la o gazdă la alta se face în raporturi din ce în ce mai mici.

Prionele mutante sunt agenţi de infecţie cu mult mai periculoşi, alcătuiţi dominant din proteine. Prionele pot produce la oi o boală denumită scrapie. Tot prionele sunt responsabile de declanşarea unor îmbolnăviri ce conduc la degenerarea sistemului nervos la oameni, cunoscută sub denumirea de boala Creuzfeld-Jacob (CFI).

Ca agent patogen al bolii vacii nebune (EBS), prionele ţin titlurile mass-mediei de circa 10 ani. Se presupune că boala a fost transmisă de la oi la vaci prin folosirea în hrana celor din urmă a făinurilor obţinute din cadavrele de oi. Pe această cale, în Anglia au fost infectate efective foarte mari de vite.

Ulterior s-a demonstrat că BSE (ESB) nu se poate dezvolta numai din prione modificate şi că mediul, modelul de furajare şi limitele biologice ale animalelor joacă un rol important în declanşarea bolii, tot aşa cum se întâmplă şi în cazul cancerului. Dar dacă totuşi o proteină a devenit agent patogen se pune întrebarea: cum poate fi acest lucru posibil atâta vreme cât ele nu au capacitatea de a se replica?

Precizăm că în mod natural prionele sunt proteine neutre care populează celulele nervoase ale sistemului nervos central. Prin urmare, ele nu sunt nici utile, nici neutile (fig. 115).

Scanned with OKEN Scanner

Prionele se transformă în agenţi patogeni asemănători viroidelor numai atunci când „sunt excitate" de factori interni care induc schimbări minore, dar suficiente pentru activarea lor. Adăugarea unui singur aminoacid este în măsură să creeze această nouă stare a prionelor.

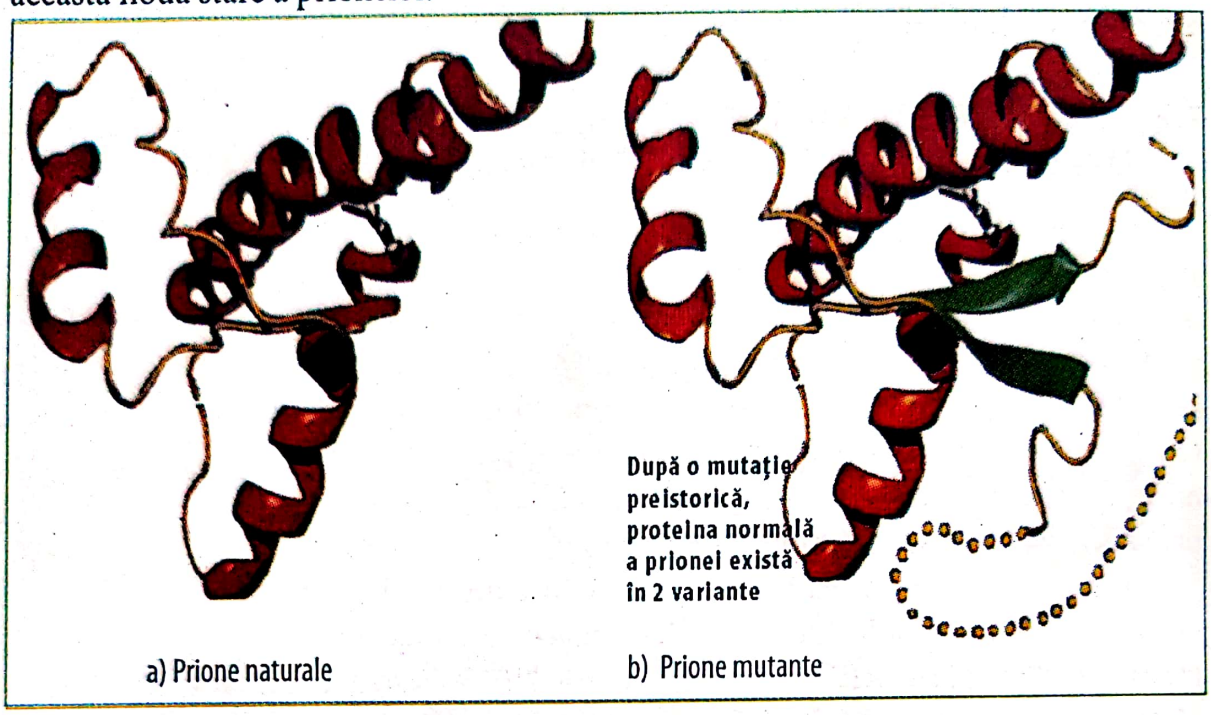


Fig. 115 – Prionele se pot găsi sub două forme (M. Berca):
a) Prione naturale care populează celulele nervoase şi spaţiile intercelulare ale sistemului nervos central la om şi diferite animale. Ele sunt neutre.
b) Prionele mutante, deseori active prin apariţia pe lanţurile polipeptidice a unor aminoacizi care cresc nivelul antropic al moleculelor proteice, proteina devenind agresivă (culoarea verde pe desen). În acelaşi timp, se creează şi posibilitatea măririi moleculei (liniile galbene întrerupte). Mutaţiile apar natural, dar pot fi induse şi de factori de stres, chimic, alimentar, de mediu. Aşa a apărut E.S.B. la bovine

Conform unei ipoteze mai noi, un prion este o alternativă neconformă a unei proteine normale care apare în anumite celule. Odată ce celula este infectată cu un prion, atunci se ajunge la catalizarea şi transformarea proteinelor normale în **versiunea - prione**. În caz că ipoteza este reală, ar putea ca o moleculă prion să declanşeze o reacţie în lanţ în urma căreia numărul de prione să crească exploziv. În felul acesta s-ar putea ca proteinele prin intermediul unei populaţii gazdă să se extindă fără efect de diluare. Numeroase laboratoare lucrează încă pentru a demonstra cum ar putea anumite proteine să acţioneze ca patogeni infecţioşi. ■

3.8.1. O altă ipoteză privind dezvoltarea virusurilor

Există bine întipărită ideea că virusurile se află într-un fel de „ceaţă" între **factorul viu şi cel neviu**. Există virusuri care sunt alcătuite din molecule complexe şi despre care putem spune că reprezintă forma cea mai simplă a vieţii? Ca întotdeauna, în a defini ceva trebuie să pornim de la realitatea descoperirilor ştiinţifice.

Scanned with OKEN Scanner

a) Prima constatare a ştiinţei este şi cea mai importantă. Un virus izolat **este biologic inert**, este incapabil de a-şi replica genele sau de a-şi regenera matricea ATP. Cu toate acestea, **el deţine un program genetic** inclus în definiţia universală a vieţii. Deşi virusurile sunt organisme de tip **„paraziţi obligatoriu intracelulari"**, ei nu pot **să se reproducă independent**. Evoluţia lor legată de viaţa vie nu poate să fie tăgăduită.

Cum au apărut însă virusurile? Deoarece înmulţirea virusurilor este legată de existenţa celulelor, este logic să presupunem că acestea nu au existat într-o formă precelulară sau mai bine zis nu au existat într-o preformă celulară şi că apariţia lor a fost ulterioară formării şi dezvoltării celulelor. Nu se poate deci nici presupune faptul că în procesul evoluţiei virusurile au fost **organisme anterioare celor celulare**. Cei mai numeroşi microbiologi acceptă şi favorizează această ipoteză. Virusurile ar fi rezultatul comasării unor fragmente celulare ale acizilor nucleici, care s-au deplasat de la o celulă la alta. Este vorba de acel material genetic scăpat de sub contorlul celulei pentru că aceasta l-a produs în exces şi nu a mai avut nevoie de el.

În favoarea acestei ipoteze vine şi alcătuirea genomului viral care, în mod normal, se presupune, este identic cu genomul plantei gazdă deşi nu este identic, nu se suprapune cu genomul unui alt virus care ocupă o altă celulă gazdă. Se poate spune că genomul viral se deosebeşte de la un virus la altul, dar de fiecare dată se apropie foarte mult de cel al celulei gazdă.

Oncogenele fac parte dintre acele genomuri virale care sunt identice cu genomul organismelor, al celulei gazdă.

Este deci posibil să gândim că primele virusuri au apărut din segmente de acizi nucleici liberi, asemănător viroizilor întâlniţi la plante şi care, folosind defecţiunile membranoase pot circula de la o celulă la alta. Evoluţia genelor spre proteine capsidice ar putea face posibilă infectarea unor celule intacte.

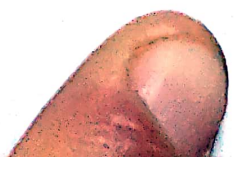
b) Cei care se aşază de partea ipotezei cum că virusurile au avut un predecesor, un înaintaş pentru genomul lor, se bazează pe 2 elemente genetice ale celulelor:

b1) **Plasmidele** sunt molecule mici ADN de formă circulară care se află în permanenţă în preajma cromozomilor. Ele se află în diferite bacterii ca şi în celule alungite, în hifele unor ciuperci. Plasmidele se pot înmulţi (replica) ca şi numeroase alte virusuri, independent de genomul celulei gazdă şi ocazional sunt transportate în alte celule.

b2) **Transpozonii** sunt elemente de ADN care au capacitatea ca în genomul unei celule să poată sări de pe o poziţie pe alta. De aceea, plasmidele, transpozonii şi virusurile îşi au anumite însuşiri comune foarte importante; cea mai importantă este mobilitatea acestor elemente genetice.

Înrudirea evoluţionară între virusuri şi genomul celulelor gazdă transformă virusurile în excelente sisteme-modele pentru biologia moleculară. Urmare a cercetărilor, controlului, replicării la virusuri, cercetătorii au acumulat o experienţă asupra reglării, replicării ADN-ului şi a expresiei genelor (transcripţie şi translaţie) în celule.

* *
*



Scanned with OKEN Scanner

Bacteriile, la rândul lor, sunt în măsură egală valoroase modele pentru cercetarea genetică, însă din motive diferite: spre deosebire de virusuri, bacteriile sunt celule reale. Ca procariote însă bacteriile oferă biologilor în domeniul geneticii moleculare posibilitatea de a cerceta fenomenele genetice pe un nivel de organizare mult mai simplu. În realitate, *Escherichia coli* este o specie model pentru biologia moleculară. Ea este la nivel molecular cel mai cercetat organism. Genetica bacteriilor va completa pe cea a virusurilor conform modelului de la simplu la complex. ■

3.9. BACTERIILE, MODELE DE EVOLUȚIE CORELATĂ CU CONDIȚIILE DE MEDIU

Dacă virusurile prin simplitatea lor au permis lămurirea unor probleme legate de construcția genetică a genelor, respectiv a acizilor nucleici, bacteriile sunt deosebit de potrivite atât în sensul adaptării prin selecție naturală cât și în sensul fiziologic al adaptării celulelor individuale la un mediu în schimbare.

Genetica, prin câteva cercetări secvenționale de profunzime ar trebui să explice de ce microbii sunt atât de plastici, de maleabili. Componenta principală a genomului bacterian o constituie coloana dublă a modelului ADN în formă circulară.

Această structură poartă denumirea de cromozom bacterian, însă ea se diferențiază foarte mult de cromozomii eucariotelor prin:

- amplasarea lineară a moleculelor de ADN;
- participarea unui număr mult mai mare de perechi de baze la formarea acizilor nucleici;
- în cazul bacteriei intestinale *E. coli*, cromozomul este alcătuit din 4 milioane de perechi de baze care reprezintă circa 3000 de gene. Asta înseamnă că bacteria conține de cel puțin 100 de ori mai mult ADN decât un virus tipic însă numai o a mia parte din ADN-ul unei celule eucariote.

Deci:

Nr. gene virus	Nr. gene bacterie	Nr. gene eucariote
4 - 30	aprox. 3000	aprox. 3.000.000 (nr. maxim)

$$3 \times 10^1 \rightarrow 3 \times 10^3 \rightarrow 3 \times 10^6$$

După cum se observă, creșterea numărului de gene și a cantității de acizi nucleici de la virusuri la eucariote este mai mult decât exponențială.

Cromozomul este foarte bine ambalat în bacterie. Cu o lungime de 1 nm, acesta este de 500 de ori mai lung decât celula. Plierea cromozomului și densitatea lui este atât de mare încât nici măcar nu ocupă întregul volum al celulei. Această regiune extrem de densă în care ADN-ul este pur și simplu presat este denumită nucleoid. Nucleoidul se diferențiază mult de nucleul eucariotelor prin faptul că:

- nu este înconjurat cu o membrană;
- cromozomul anumitor bacterii conține plasmide, adică segmente foarte mici de ADN circular, care dețin maximum 20 de gene.

Scanned with OKEN Scanner

Înmulţirea (replicarea) bacteriilor se face prin dedublarea materialului genetic aşa cum deja am văzut. Procesul de dedublare, copiere a ADN-ului începe de la locul de start al replicării în amândouă direcţiile cromozomului circular (fig. 116).

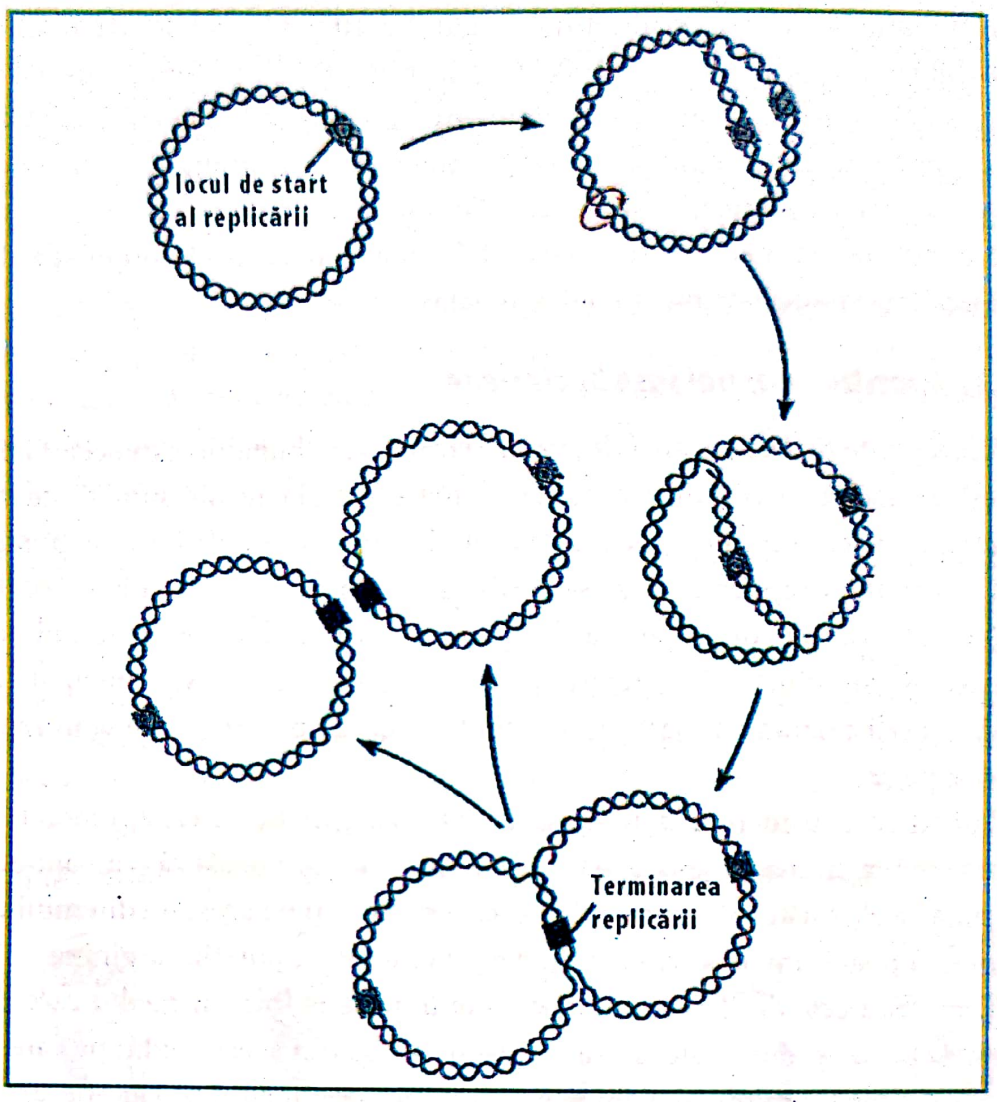


Fig. 116 – Replicarea (înmulţirea) cromozomilor bacterieni.
Pornind de la o poziţie de „start", replicarea ADN-ului se derulează atât în stânga cât şi în dreapta, de-a lungul cromozomului circular până când acesta se replică complet.
Anumite enzime, printre care topoisomeraza, secţionează ADN-ul, îndepărtează şi iarăşi uneşte, tocmai pentru a asigura înnodarea, răsucirea. Procedeul este asemănător activităţii de tricotat (unu pe faţă, unu pe dos)

În condiţii bune de creştere, bacteriile se înmulţesc foarte repede, atât în condiţii naturale cât şi în laborator. *E. coli* în asemenea condiţii îşi dublează efectivul la fiecare 20 minute. O cultură care porneşte replicarea cu o singură celulă, după 12 ore, îşi formează o colonie de 10^7 până la 10^8 celule.

În intestinul gros, *E.coli* se înmulţeşte atât de repede încât într-o singură zi apar 2 x 10^{10} descendenţi, care sunt eliminaţi odată cu fecalele. Deoarece dedublarea celulelor se face după procedeul asexuat, întregul număr de indivizi ai unei colonii este gene-

Scanned with OKEN Scanner

tic identic cu cel al celulei de pornire. Există însă şi posibilitatea să apară şi mutaţii, în care caz anumiţi urmaşi se prezintă cu modificări în genotip. Însă pentru o genă de *E. coli* posibilitatea apariţiei unei mutaţii este de 1×10^{-7} pe celulă divizată. Dar fiindcă zilnic se produc în intestinul uman 2×10^{10} noi celule de *E. coli*, există şi probabilitatea apariţiei a circa 2000 *E. coli* mutante. Dacă fiecare are câte 3000 de gene, genele mutante create în intestinul omului ajung la 6 milioane/zi (3000 x 2000). Aceste mutaţii, deşi par numeric puţine, imprimă o anumită diversitate care poate influenţa evoluţia populaţiei bacteriene. Populaţia mutantă poate creşte foarte repede, dacă condiţiile de mediu îi sunt favorabile, mai repede decât populaţia de origine, dacă aceleaşi condiţii de mediu îi devin nefavorabile. ■

3.9.1. Apariţia unor noi suşe bacteriene

Viaţa poate proveni numai din viaţă, dar nu este obligatoriu ca această bio-chimie a vieţii să nască în continuare numai materie vie. Bacteriile sunt fiinţe vii, supuse selecţiei naturale, care depinde foarte mult de variaţia indivizilor unei populaţii.

Un fenomen interesant care se constată în lumea bacteriană este **recombinaţia** văzută ca o combinaţie a materialelor genetice a doi indivizi în genomul unui singur individ. Recombinaţia la bacterii poate fi demonstrată experimental, cercetarea punând la dispoziţia cunoaşterii mai multe metode pe care nu le vom reproduce în acest material.

Luând în considerare două suşe de bacterii genetic diferite, crescute pe medii minimale (ex. numai glucoză), dar care nu pot sintetiza decât câte un aminoacid vom constata că ele nu au capacitatea de a creşte şi înmulţi pe acest mediu minimal pentru că una nu poate sintetiza triptofanul, iar alta nu poate sintetiza arginina.

Dacă însă cele două suşe sunt crescute împreună într-un mediu care conţine cei doi aminoacizi şi după câteva ore extragem probe din acest mediu pe care le transferăm pe un mediu minimal, vom constata că pe acest mediu pe care fiecare suşă luată izolat nu se putea înmulţi, vor apare de această dată colonii de bacterii. Cercetătorii au constatat că fiecare colonie provine dintr-o singură bacterie, care de această dată poate sintetiza atât arginina cât şi triptofanul.

Acest lucru a condus la concluzia că mediul sărac a obligat bacteriile „starter" să împrumute una de la alta genele care le lipseau pentru a putea sintetiza aminoacidul absent. Spunem deci că s-a realizat fenomenul de recombinaţie, definit mai sus.

Văzute mecanic, putem afirma că recombinaţia la bacterii se diferenţiază de recombinaţia la eucariote. În ciclul sexuat de dezvoltare, materialul genetic al indivizilor aparţinând a două eucariote se găseşte reunit într-un singur zigot. Nu există la procariote sexualitate în sensul cunoscut la eucariote. Meioza şi fecundarea nu vor fi niciodată depistate la procariote. Aceasta este deosebirea care face marea diferenţă între pro şi eucariote.

Recombinaţia la bacterii se bazează pe procesele descrise în continuare. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.9.1.1. Transformație, transducție și conjugare

a) Pe scurt despre transformație (transformare)

Prin **transformație** se definește o modificare a genotipului unei celule bacteriene prin asimilarea unui ADN liber din mediul imediat. Bacteriile inactive din specia *Streptococcus pneumoniae* nu dețin o capsulă secretoare și, ca urmare, pot prelua ADN liber din mediu. Ele îl preiau de regulă de la celule moarte ale sușelor infecțioase care au capsulă. Urmează o transformare a indivizilor bacterieni care provoacă pneumonia. Fenomenul a fost descoperit încă din 1928 de Frederick Griffith, un medic englez (fig. 117).

Firește că Griffith nu a cunoscut atunci structura chimică a agentului de transformare, lucru descoperit de cercetători cu mult mai târziu. Cu toate acestea, utilizarea căldurii pentru urmărirea celulelor „S" a dus la concluzia că nu este o proteină, care normal ar fi coagulat. După multe cercetări și îndoieli, s-a concluzionat însă că agentul de transformare este tot un ADN și că proteinele acestuia au rezistență mult mai mare decât cele obișnuite.

S-a demonstrat totodată că transformarea se poate obține foarte repede dacă bacteria vie, fără capsulă absoarbe fie și numai un mic fragment ADN pe care întâmplător gena îl produce pentru capsulele protectoare. Alela străină este înglobată în cromozomul bacterian unde înlocuiește alela prezentă acolo pentru versiunea fără capsulă printr-un schimb de ADN asemănător crossing-over-ului în meioza eucariotelor. Celula transformată deține acum un cromozom care conține ADN-ul unei alte celule. Acest fenomen definește și el termenul de recombinare, despre care s-a scris mai sus.

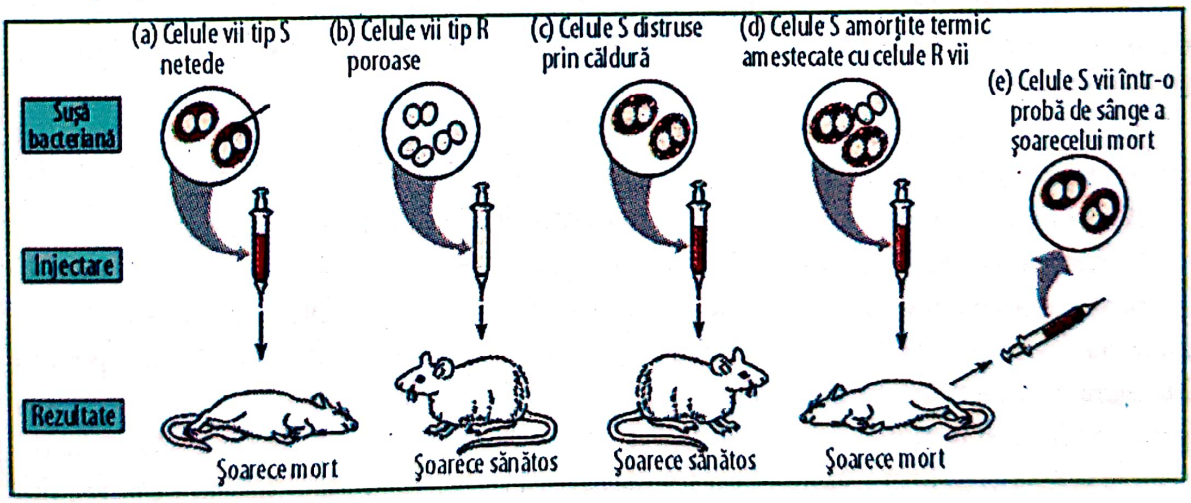


Fig. 117 – Transformarea unei bacterii conform cercetărilor lui Griffith
a) Sușa S a bacteriei *Streptococcus pneumoniae*, ale cărei celule se separă de sistemul imunologic al șoarecelui cu ajutorul unei celule secretoare este patogenă și prin injectare șoarecele moare.
b) Sușa R este o mutantă fără capsulă și a fost inofensivă
c) Celulele sușei S distruse termic au fost și ele inofensive.
d) Amestecul dintre celulele sușei S și celulele R normal inofensive dezvoltă pneumonia mortală la șoareci.
e) Din acești șoareci omorâți de amestec s-au putut izola celule S vii. Logic, Griffith a ajuns la concluzia că o moleculă din celula moartă S a fost transferată genetic în celula R. Transformarea deci s-a produs

Scanned with OKEN Scanner

Timp de peste 100 de ani de la această descoperire cei mai mulți biologi au considerat acest proces ca fiind prea rar și prea puțin periculos în comparație cu rolul real pe care acesta îl joacă în populațiile bacteriene.

Căci, mai târziu s-a descoperit că numeroase specii de bacterii dețin proteine pe suprafețele lor, care au capacitatea și sunt specializate în a reține ADN-ul liber din mediul înconjurător. Aceste proteine recunosc și transportă selectiv numai acele forme de ADN foarte înrudite cu specia bacteriană. Nu toate bacteriile dețin asemenea membrane proteice. Se pare că *E. coli* nu posedă un asemenea mecanism specializat pentru preluarea ADN-ului străin. ,

Dacă însă în cultura de *E. coli* se adaugă mediului nutritiv o concentrație relativ ridicată de ioni de Ca^+, celulele vor fi stimulate pentru acceptarea - preluarea unor mici segmente ADN.

ATENȚIE !

Am insistat asupra fenomenului de transformare prin recombinare pentru că această metodă este folosită în tehnologiile genetice pentru a introduce în celule bacteriene gene străine, dorite de biotehnician, gene care codifică proteine foarte valoroase pentru medicină așa cum este, de exemplu, **insulina**, sau cum este cazul hormonului inhibitor al creșterii cunoscut sub denumirea de **Somatostatin**.

Bacteriile pot fi folosite, de asemenea, ca transportori ai unor gene dorite și în inducerea rezistenței plantelor la unele boli altminteri greu de controlat.

b) Procesul de transducție

Prin transducție se definește acel mecanism de recombinare în care o genă este transferată de la o celulă la alta cu ajutorul unui bacteriofag. Se cunosc două forme de transducție:

- transducția generală;
- tranducția specifică.

Amândouă descresc aberațiile, anormalitățile ciclului infecțios al fagilor.

Transducția generală este prezentată în figura 118.

S-a arătat anterior că, la sfârșitul ciclului lisic al unui fag, moleculele virale ale acizilor nucleici sunt împachetate în capsidă și în această formă finală fagii sunt puși în libertate, firește după ce celula gazdă a lisat, adică a plesnit. Odată cu plesnirea celulei gazdă rezultă și numeroase segmente mai mici sau mai mari ale ADN-ului acesteia.

De obicei și apărut întâmplător, un asemenea segment înlocuind genomul fagului ajunge în locul acestuia și este înglobat în capsidă. Un asemenea fag nu mai este fag, este o „defecțiune" căreia i se spune în biologia moleculară „fag defect" pentru că îi lipsește materialul genetic propriu. Acest fag defect, această capsidă virală, deține informația necesară spre a se orienta spre o altă bacterie, ea, capsida, fiind constituită din proteine de natură virală și pătrunde într-o nouă bacterie, infectându-și și ADN-ul fals.

Acest fragment de ADN se poate așeza în noua celulă (a doua) pe zona omoloagă a cromozomului printr-un proces molecular asemănător crossing-over-ului la eucariote.

Scanned with OKEN Scanner

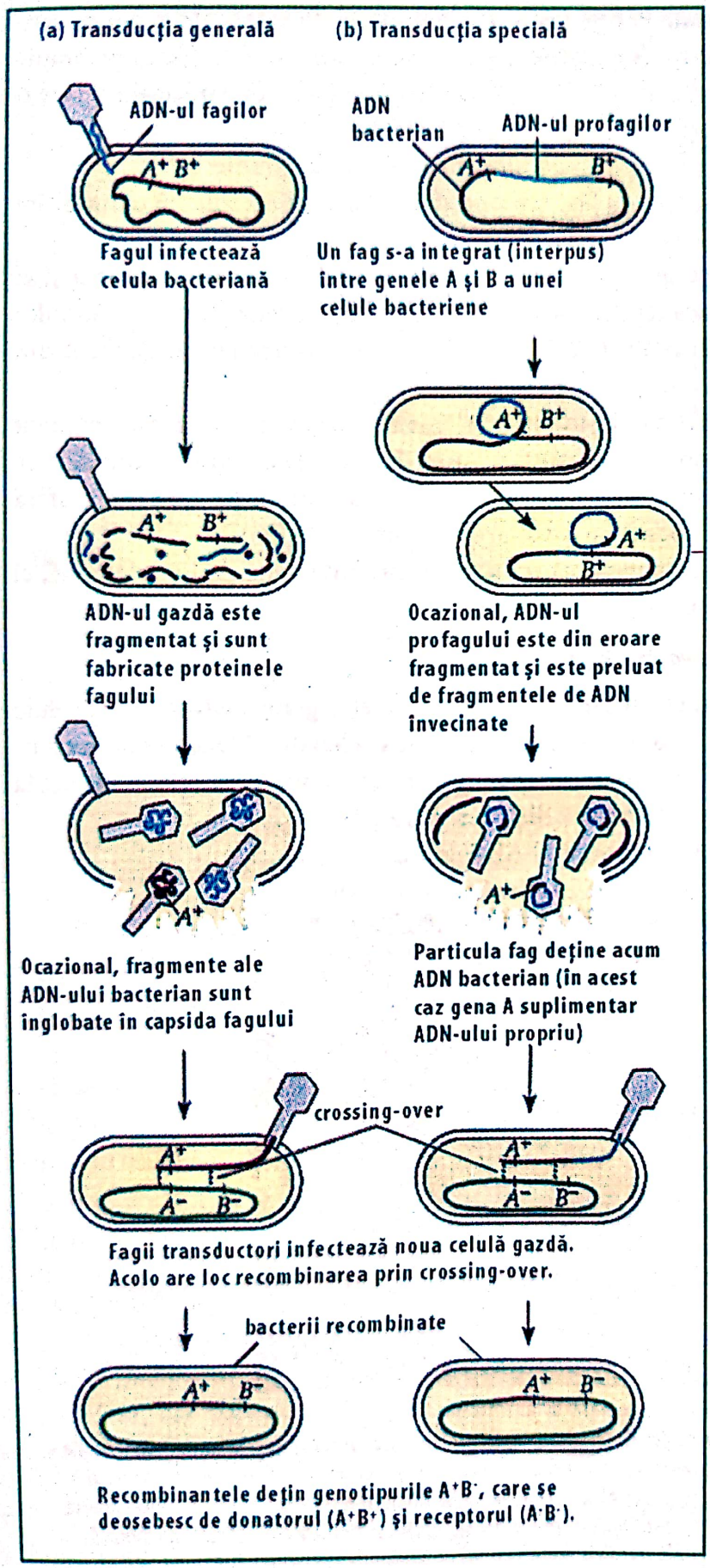


Fig. 118 – Schema derulării transducției.

Constă în faptul că genele bacteriene ale unei celule pot fi transferate ocazional unei alte celule, cu ajutorul unor viruși fagi.

a) În cazul transducției generale, în mod întâmplător fragmente ale genomului celulelor gazdă sunt împachetate în capsida virusului fag.

b) În cazul transducției speciale, virusul decupează din genomul gazdă un segment, o genă pe care o preia cu el și o induce în altă celulă vecină.

În ambele cazuri ale transducției, părți din ADN-ul transferat se pot recombina cu genomul noii celule gazdă (*după Campbell A.N., 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

Cromozomul acestei celule deţine acum o combinaţie de materiale genetice care provine de la 2 indivizi diferiţi. A avut loc, aşa cum am arătat în definiţie, o recombinare denumită în cazul acestui procedeu **transducţie generală**, deoarece el nu face o selecţie a genelor pe care fagul le transportă şi transferă.

Transducţia specială sau specifică necesită alte condiţii, şi anume:

- Infecţia bacteriilor se face cu fagi temperaţi, blânzi, care nu solicită o înmulţire lisică, ci una lisogenică.
- Genomul unui asemenea fag infectat în celula gazdă se numeşte profag şi el este integrat pe o locaţie specifică, de regulă între două gene ale cromozomului gazdă. Mai târziu genomul poate fi, la o comandă infogenetică, decupat din cromozomul gazdei.
- Cu această ocazie şi, de regulă, tot întâmplător el preia cu sine şi un mic segment al ADN-ului bacterian care se găseşte alături de zona de integrare a profagului. Noul virus format conţine, de asemenea, ADN bacterian pe care îl transferă unei alte celule gazdă odată cu infectarea genomului fagului.

Transducţia este specifică pentru că nu sunt transferate gene „întâmplătoare", ci genele specifice mai sus descrise.

c) Procesul de conjugaţii şi definirea plasmidelor

Conjugaţia reprezintă un transfer direct al materialelor genetice între două celule bacteriene care s-au unit aflându-se una în vecinătatea celeilalte. Mecanismul recombinaţiei genetice a versiunii bacteriene a sexualităţii a fost cu mare exactitate studiat la *E. coli*. Transferul de ADN se derulează dirijat, şi anume:

- o celulă funcţionează ca donator al ADN-ului;
- cealaltă celulă funcţionează ca „partener" - acceptor.

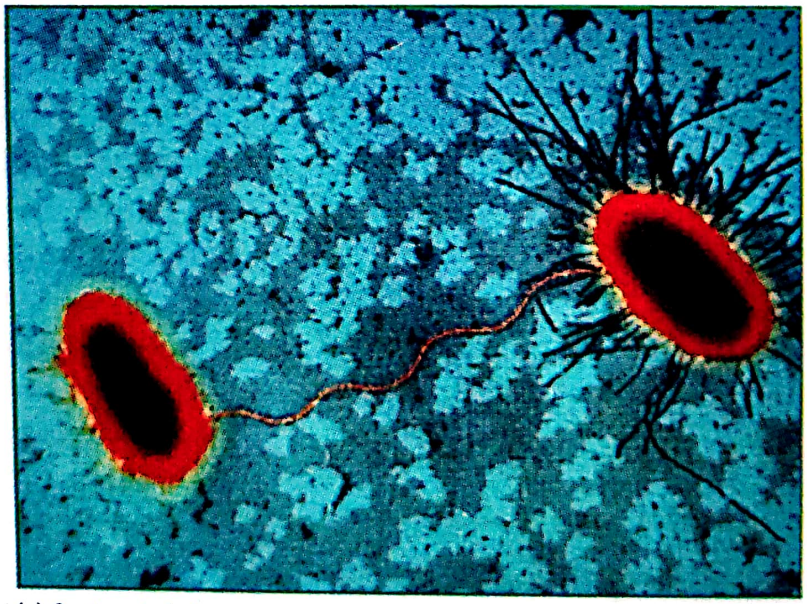


Fig. 119 – (a) Conjuncţia la bacterii – o fotografie la microscopul electronic
Varianta „masculină" a celulei *E. coli* (dreapta) îşi prelungeşte un sexpilus şi ia contact cu o celulă feminină. Apoi cei 2 parteneri se împerechează prin crearea unui pod citoplasmatic. Prin acest „tub" partenerul masculin îşi transferă ADN-ul celui feminin. După cum s-a spus, acest mecanism poartă denumirea de conjugaţie (TEM colorat) *(după Dennis Kunkel/Phototake NYC coloraţie modificată)*

Scanned with OKEN Scanner

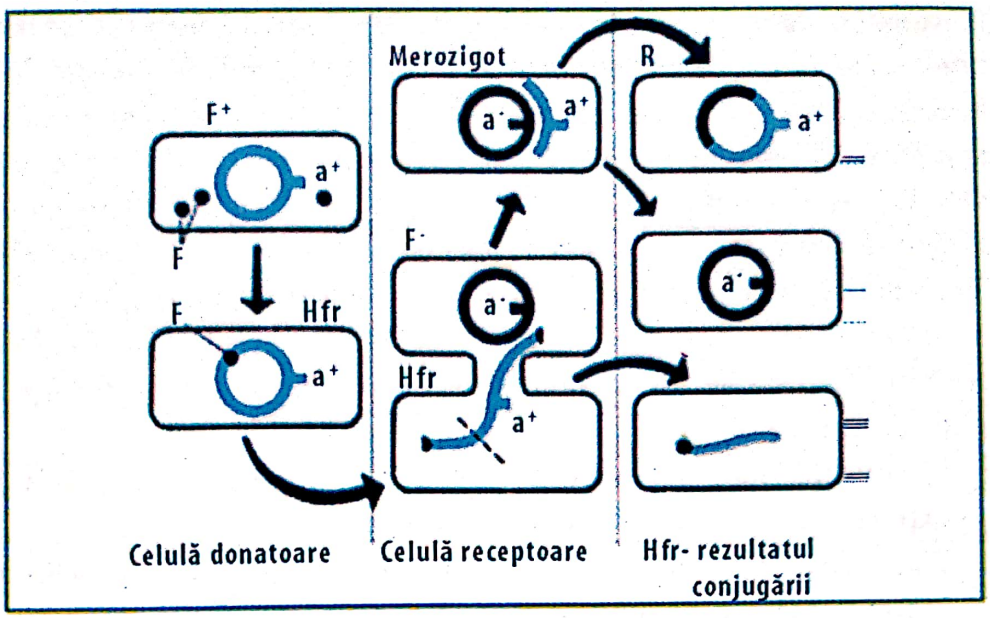


Fig. 119 – (b) Schema conjugației la bacterii, în care:

F = pilus (sexpilus);

F^- = celulă receptoare lipsită de factor de fertilizare;

F^+ = factor de fertilizare al celulei donatoare.

Factorul de fertilizare își integrează materialul genetic pe cel al celulei receptoare. Rezultă celule Hfr (high frecvency of recombination). Aceste celule pot fi parțial diploide (celula dreapta sus).

- Celula receptoare, după primirea ADN-ului de la donator, capătă denumirea de **merozigot** (de la grecescul *mero* = parte, bucată, porțiune, deci o parte a zigotului)
- Transferul ADN-ului cromozomial prin factorul F mai este denumit și **sexduction**

Donatorul este cotat ca „partener masculin" și este deținătorul unor cili întăritori ai celulei denumiți sexpili (singular sexpilus) cu ajutorul cărora se cuplează la „partenerul feminin".

Imediat se formează un „pod citoplasmatic temporar între cele două celule care va servi la transferul ADN-ului masculin (fig. 119). „Masculinitatea" celulei donatoare nu se manifestă numai prin capacitatea celulei de a forma sexpili și la donarea ADN-ului, ci acest lucru este determinat de prezența în celulă a unui plasmid, denumit plasmid F. Acesta este unul din numeroasele și diferitele tipuri de plasmide descoperite în bacterii.

d) Definirea și caracteristicile plasmidelor

Un plasmid este o formațiune mică de formă circulară formată din molecule de ADN independente de cromozomul bacteriei. Plasmidele replică, se înmulțesc independent, dar oarecum sincronizat cu replicarea cromozomului. Multe plasmide se replică după propriul lor program și cu timpul se poate modifica numărul de plasmide ale celulei.

Anumite plasmide arată, indică cu totul diferit și interesant. Ele se pot îngloba reversibil în cromozomul celulei. Din aceasta derivă noțiunea de **episom**

Scanned with OKEN Scanner

Episomul se defineşte deci ca un element genetic care îşi alege modul de replicare, fie extracromozomial, prin replicarea moleculei independente, fie simultan cu cromozomul principal, ca o componentă a acestuia. Plasmide extrem de specifice care intră în grupa episomilor s-au dovedit a fi virusurile temperate de tip ‚r' despre care am scris mai sus. Genomul acestor fagi se înmulţeşte (replică) pe parcursul ciclului lisic, liberi în citoplasmă, în timp ce pe ciclul lisogenic, ei se înmulţesc odată cu cromozomul gazdei, fiind parte integrată a acestuia. S-a emis ipoteza, şi ea prezentată mai sus, că anumite virusuri s-au dezvoltat evolutiv odată cu evoluţia plasmidelor. Ipoteza nu poate fi acceptată de majoritatea biologilor pentru că există diferenţe mari între plasmide şi virusuri, şi anume:

- Plasmidele, spre deosebire de virusuri nu se găsesc niciodată în spaţiul extracelular, neavând un asemenea stadiu.
- Plasmidele reprezintă o parte integrală a dotării genetice a celulelor bacteriene, în timp ce virusurile sunt paraziţi, adică dăunează celulei gazdă.
- Fiecare plasmid deţine un număr mic de gene şi în condiţii normale nu sunt necesare supravieţuirii sau reproducţiei bacterii (ele reprezintă 1-2% din întregul genom al bacteriei).
- Genele plasmide pot însă să fie folositoare dacă bacteriile se plasează în condiţii nefavorabile.

Plasmida F (factorul F) creează posibilitatea recombinării, ale cărei avantaje sunt evidente dacă schimbările de mediu ale suşei de bacterii existente nu mai stimulează populaţia existentă (vezi fig. 119b).

e) Ce sunt transposonii - rezistenţa la antibiotice

Transpozonii sunt secvenţe de ADN care îşi pot schimba locul în genomul celular, adică sunt transponibile sau transpoziţionabile. În bacterii s-a demonstrat modul în care transpozonii se deplasează pe cromozom de la un loc la altul. Pe de altă parte, ei pot să sară de pe un plasmid pe cromozom şi invers sau se schimbă de pe un plasmid pe altul şi invers.

Transpozonii sunt, de fapt, responsabili pentru combinarea deiferitelor gene şi crearea fenomenului de rezistenţă la antibiotice într-o plasmidă singulară în care s-au acumulat gene din diferite alte plasmide.

Uneori transpozonii mai sunt denumiţi şi „gene săritoare". Această definire este însă suficient de hazardată, dar are şi ceva real în ea, căci genele într-un fel sar de pe o poziţie a genomului pe alta, iar acest procedeu se numeşte „transpoziţie conservativă". În acest caz, gena „care sare", gena transpozonului, nu se dedublează înainte ca transposomul să se mişte. Ca urmare, numărul de gene rămâne constant (conservat).

„Transpoziţia replicativă" presupune o replicare a genei pe poziţia sa de bază, urmând ca o copie a acesteia să fie inclusă pe o altă locaţie a genomului. Cu alte cuvinte, gena poate fi transferată pe un alt loc al genomului fără a părăsi locul de origine. Această însuşire a transpozonului prin care anumite gene sunt distribuite prin

Scanned with OKEN Scanner

întregul genom fac din transpoziție un mecanism care se deosebește fundamental de restul mecanismelor care implică amestecarea genelor. Celelalte mecanisme, precum crossing-over-ul la meioza eucariotelor, precum și cele de recombinare la procariote (transformația, transducția și conjugația) conduc la un schimb al alelelor între regiuni analoge ale ADN-ului. Integrarea plasmidelor episomale într-un cromozom este, de asemenea, specifică unui loc. Plasmidele, în general, ocupă un loc bine poziționat în cromozomi. Dimpotrivă, în cazul transpoziției, genele sunt aduse în genom pe locuri unde anterior acest tip de gene niciodată n-a fost găsit.

Există numeroase tipuri de transpozoni. Cei mai simpli sunt secvențele de inserție în care mutarea genelor de pe un loc pe altul se face cu ajutorul unei enzime (transposază) care catalizează această mișcare. Acești transpozoni simpli sunt mai puțin importanți pentru tehnologiile moleculare.

Revenind la plasmide, trebuie să recunoaștem că acestea sunt de mare folos celulei gazdă. Cu toate acestea, ele conțin gene mai ales în anumiți transpozoni care codifică (codează) fabricarea anumitor enzime care inactivează antibioticele. Acest lucru se realizează în **plasmide rezistente** sau **r-plasmide** prin intermediul așa-numiților **transpozoni complecși** (fig. 120).

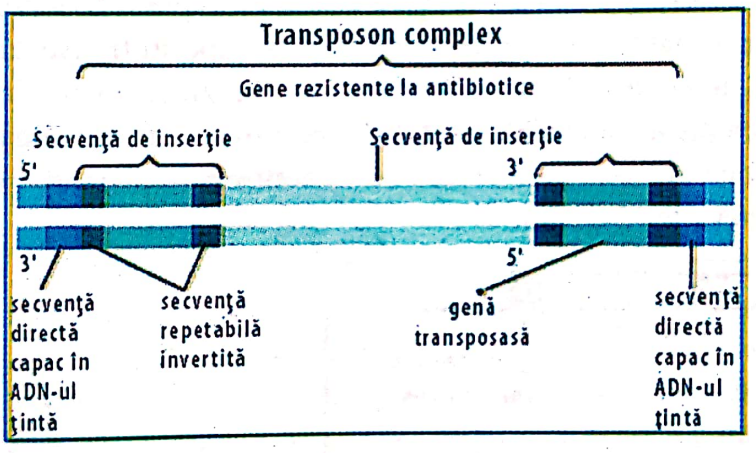


Fig. 120 – Structura unui transpozon complex
Un transpozon constă din una sau mai multe gene care se interpun între două secvențe de inserție. În acest caz, o genă rezistentă la un anumit antibiotic este cotransportată ca parte a transpozonului complex și integrată pe o nouă poziție a genomului. Un asemenea model de transport poate transfera o genă rezistentă la un antibiotic și unui alt plasmid care mai deține deja încă una sau mai multe gene rezistente. Prin diviziunea celulei sau conjugație, diferitele gene rezistente pot fi diseminate, întreaga masă de microbi devenind rezistentă (*prelucrare după Lexicon der Biochemie, 2004*)

Asemenea plasmide rezistente creează probleme deosebite procesului medical de combatere a bacteriilor patogene. Odată cu extinderea utilizării antibioticelor s-au dezvoltat și plasmide cu un număr mai mare de gene rezistente, care fac ca celula gazdă (bacteria) să devină rezistentă împotriva mai multor antibiotice. Așa cum am arătata, plasmidele conțin „transfergene" (gene transferabile) care trec de la o celulă bacteriană la alta prin unul din procedeele prezentate mai sus (conjugare prin pilus, transducție, transposomie etc.). Aceste transferuri pot conduce la un număr atât de

Scanned with OKEN Scanner

mare de plasmide rezistente la antibiotice încât într-un anumit mediu (un spital, de exemplu) sau pentru o anumită boală (tuberculoza), antibioticele pur şi simplu nu mai pot fi folosite. De aceea, lupta împotriva extinderii plasmidelor rezistente este o temă extrem de importantă a medicinei moderne.

Transpozonii bacterieni ajută bacteriile să se adapteze mai bine la mediu. Prin selecţia clonală a acestor bacterii datorită numeroaselor fenomene de transpoziţie se realizează r-plasmide care realizează contextul inutilităţii antibioticelor.

Mai trebuie adăugat că elementele genetice mobile nu se limitează numai la bacterii, ci ele sunt şi componente importante ale genomului eucariotelor. Dovezi în acest sens au fost aduse încă din perioada anilor '50 de către cercetătoarea americană Barbara Mc Clintock prin experimente de detaliu asupra ameliorării porumbului.

Barbara Mc Clintock a observat modificări în culoarea bobului de porumb care n-ar fi putut fi explicate decât prin existenţa EGM-urilor, elemente genetice mobile, care de pe o anumită poziţie în genom sar (se deplasează brusc) în genele ce conţin informaţia pentru culoarea bobului. Ea a denumit aceste EGM-uri elemente de control (fig. 121) deoarece erau înglobate în genom alături de gene responsabile de imprimarea culorii bobului. Prin înglobarea acestor elemente genele în cauză erau fie activate, fie inactivate. Descoperirea savantei americane n-a putut fi deplin lămurită decât după ce mulţi ani mai târziu (peste 30) au fost descoperiţi transpozonii bacterieni. Aceştia au fost descoperiţi în anul 1893, cu care ocazie la vârsta de 81 de ani Barbara Mc Clintock a primit şi Premiul Nobel, iar cercetările au fost reluate la Cold Spring Harbour-Labour în New-York, cercetând în continuare până în 1992, când a murit la frumoasa vârstă de 90 de ani.

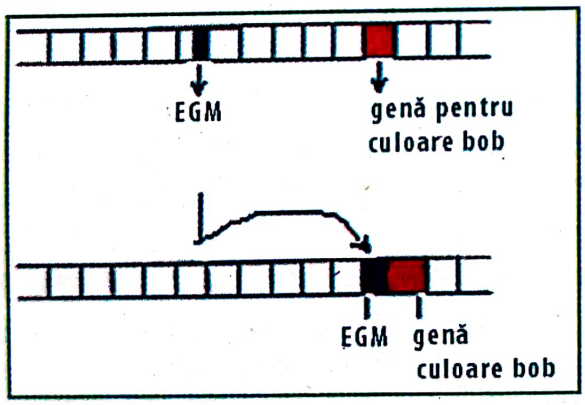


Fig. 121 – Deplasarea EGM-urilor (elemente genetice mobile) spre gena specifică a culorii bobului de porumb.
a) EGM-urile se află pe o anumită poziţie a genomului (EGM = element genetic mobil);
b) EGM-urile stau alături de gena specifică care imprimă culoarea, activând-o sau inactivând-o. Prin amândouă procedeele bobul capătă o altă culoare decât cea imprimată parţial de genă (*M. Berca*)

g) Modificarea plasmidelor bacteriene şi folosirea lor ca vectori de clonare

Bacteria *E.coli* este foarte frecvent folosită în tehnologiile genetice, fiind foarte potrivită pentru înmulţirea unor plasmide induse folosite apoi cu succes în tehnicile de recombinare a ADN-ului. Recombinarea este una din metodele frecvent utilizate

Scanned with OKEN Scanner

în elaborarea unor biotehnologii care să conţină informaţia necesară obţinerii unui efect dorit, a însuşirii căutate, dorite, într-un fenotip, fie el plantă sau animal. Aceste plasmide pot fi atât de bine construite şi optimizate încât se potrivesc foarte bine ca vectori pentru clonarea ADN-ului. Procedeul serveşte la micşorarea plasmidelor de o manieră care să le permită o mai bună manipulare. Ele sunt cu mult mai mici decât plasmidele naturale ale lui *E. coli*. De regulă, **plasmidele induse**, denumite şi **plasmide vectori**, au o dimensiune de maximum 3 kb. Constructiv, majoritatea acestor vectori constau din secvenţe nucleotide care servesc exclusiv şi necesar clonării ADN. Pornind de la un starter de replicare (punct de replicare), o genă rezistentă şi un domeniu conex în care pot fi introduse fragmentele de ADN -exogen (fig. 122).

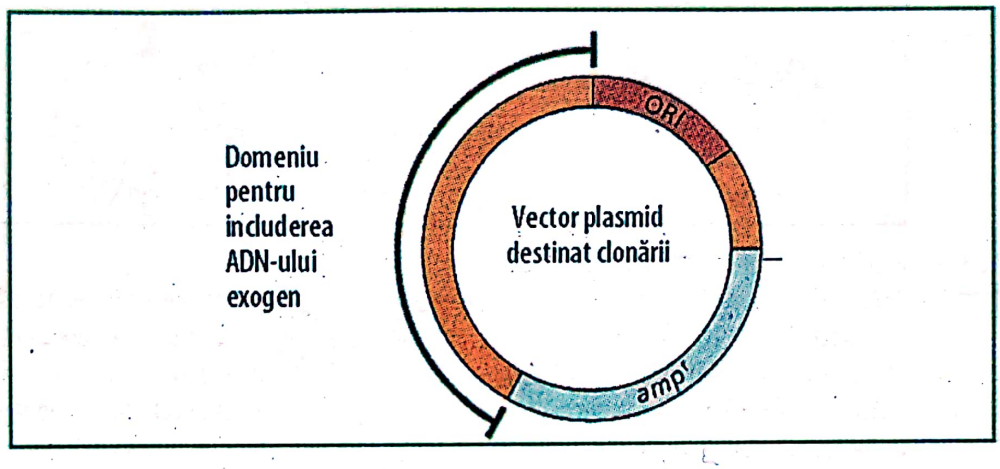


Fig. 122 – Prezentarea unui simplu vector de clonare
Acesta derivă dintr-un plasmid bacterian care a fost replicat sub forma unor molecule aranjate în dublu-bandă circulară în celula lui *E. coli*.
Vectorii plasmidici sunt de dimensiuni 1,2 - 3 kb. Ei conţin o zonă de starter a replicării (ORI) (origin of replication) ca şi o genă de selecţie care, de obicei, intermediază o rezistenţă împotriva unui antibiotic. În acest caz este vorba de o genă care codează enzima β-lactamază. Se cunoaşte deja că β-lactamaza inactivează ampicilina. ADN-ul exogen poate fi introdus în zona prinsă în paranteze, fără a deranja capacitatea de replicare a plasmidelor şi nici exprimarea genei amp^r
(*prelucrare după Lodish şi colab., 2001*)

Ar trebui să mai precizăm că gena rezistentă se referă în acest caz la ampicilină. Pot fi însă la fel de bine construiţi vectori de clonare care conţin gene ce induc rezistenţe foarte utile atât în zona plantelor de cultură cât şi a animalelor de producţie.

Replicarea ADN-ului plasmidic. Zona de pornire a replicării (origin of replication, ORI) constă dintr-o secvenţă ADN alcătuită din 50 - 100 perechi de baze specifice, care oferă plasmidului capacitatea de replicare. Enzime ale celulei gazdă se leagă în regiunea ORI şi coordonează de acolo replicarea plasmizilor circulari. După iniţierea replicării în zona ORI, aceasta se extinde în dreapta şi în stânga acestuia independent de secvenţa de nucleotide conţinute în ORI (fig. 123). În felul acesta, fiecare secvenţă ADN dorită care a fost introdusă într-un asemenea plasmid este lăsată să se replice (înmulţească) împreună cu restul ADN-ului plasmidei. Această însuşire deosebită creează baza clonării ADN-ului atât de dorit în biotehnologie.

Scanned with OKEN Scanner

h) Selecția celulelor transformate

Un grup de cercetători, format din O.T. Avery, C.M. Macleod și M.Mc Carty, toți americani, reușește pentru prima dată încă din 1944 să efectueze un transfer de gene cu un ADN izolat din *Streptococcus pneumoniae.*

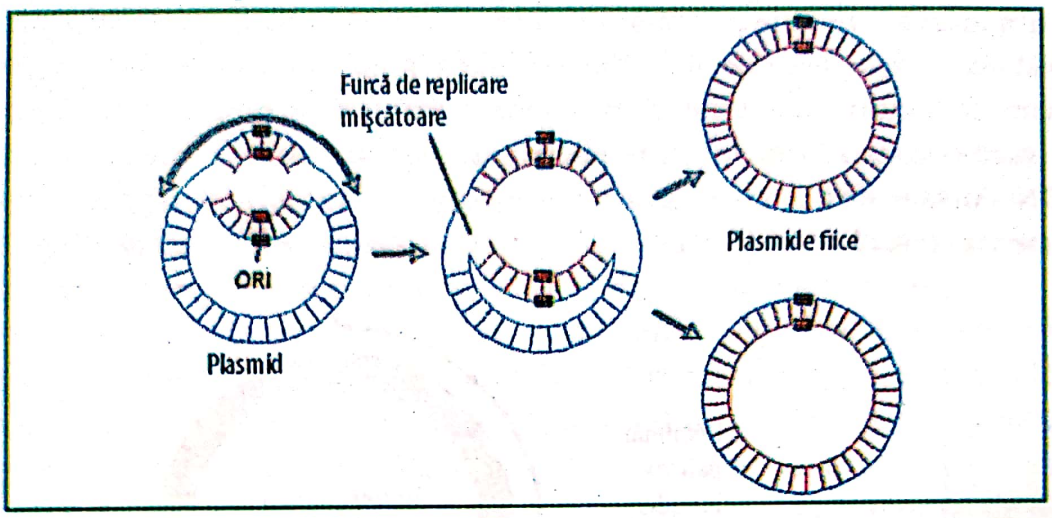


Fig. 123 – Replicarea ADN-ului plasmidic
Benzile desenate albastru aparțin plasmidelor părinți. În roșu au fost desenate benzile fiică nou sintetizate. Liniile care leagă benzile reprezintă perechile de baze A - T și G - C care unesc una cu alta benzile complementare. După declanșarea replicării ADN-ului pe zone ORI (galben), replicarea continuă circular în ambele direcții ale moleculei până în momentul în care furcile de replicare se întâlnesc și rezultă 2 molecule fiică. Zona de replicare este singura secvență nucleotidă specifică necesară pentru construcția întregii molecule circulare

Acest experiment se bazează pe modificarea genetică a unei celule bacteriene prin preluarea unei molecule ADN dintr-o altă bacterie diferită genetic, după ce această moleculă a fost izolată. Adusă în celula gazdă, aceasta a fost recombinată cu genomul celulei gazdă. Despre acest proces denumit transformație am vorbit mai sus și nu vom mai insista asupra lui.

Aici precizăm însă a doua importanță a procesului, și anume comportamentul celulelor normale, transformate în medii de cultură spre deosebire de celulele netransformate, adică acelea care n-au primit prin injecție plasmidică vectorii clonării. Celulele clonate în medii de cultură au o creștere continuă, nelimitată ca în cazul celor normale. Or, acest lucru le aseamănă foarte mult cu celulele canceroase.

Clonarea plasmidică permite izolarea unor fragmente ADN din amestecurile complexe.

Se pornește de la constatarea că un vector plasmidic permite introducerea în componența sa a unei secvențe ADN de o dimensiune redusă de perechi de baze, și anume până la 20 kb (kilobasen). În cazul lui *E. coli*, a cărui celulă nouă a primit plasmidul vector recombinat se întâmplă următoarele în mediul de cultură:

a) Toate celulele din descendență vor conține plasmide cu aceeași secvență de ADN introdusă prin transformare în celula mamă (fig. 124).
b) În timp ce colonia crește, ADN-ul indus replică împreună cu cel uzual al plasmidului și este repartizat în egală măsură celulelor fiice.
c) În acest fel, prin multiplicarea fragmentelor ADN, rezultă în colonie un număr mare de copii identice.

Scanned with OKEN Scanner

d) Toate celulele colonice care derivă dintr-o singură celulă părinte formează clon celular.

e) Fragmentul ADN introdus în plasmidul tată (vector) este denumit ADN-clonă sau clonat.

Cu ajutorul ADN-ului clonă pot fi izolate fragmente care deţin o anumită secvenţă de nucleotide dintr-un amestec complex format din numeroase şi diferite alte secvenţe. Pentru a demonstra acest lucru, cercetătorii au organizat experienţa prezentată în figura 125.

- Se porneşte de la un amestec soluţie ADN format din numeroase copii ale diferitelor fragmente ADN care conţin diferite secvenţe.
- Fiecare fragment este introdus într-o moleculă plasmidică:

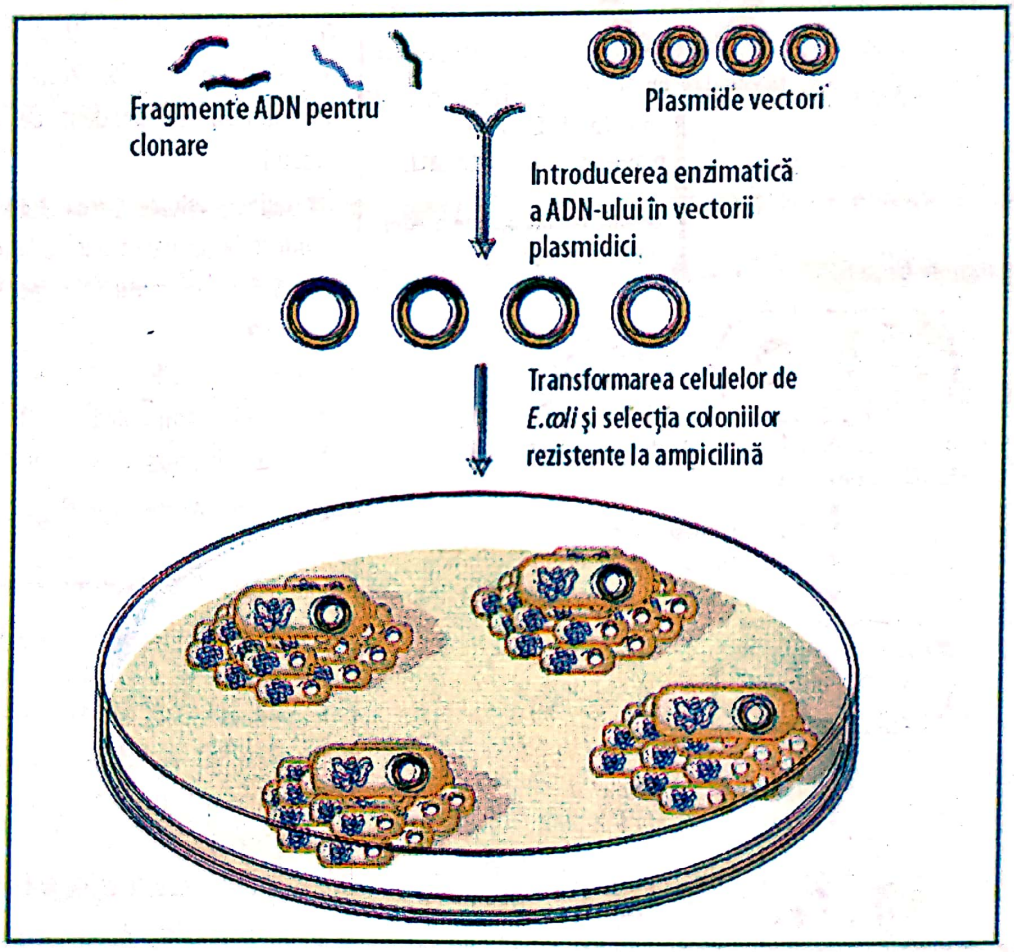


Fig. 124 – Izolarea fragmentelor de ADN dintr-un amestec prin clonare în vectori plasmidici (plasmizi vectori) Diferite fragmente ADN desenate în culori diferite sunt introduse în vectorul de clonare plasmidic. Rezultă un amestec de plasmide recombinate, fiecare conţinând un singur fragment ADN. Celulele de *E.coli* în prezenţa $CaCl_2$ sunt incubate cu plasmide şi apoi depuse pe un mediu de cultură ce conţine ampicilină. Fiecare colonie care creşte conţine celule rezistente la antibiotic şi provine dintr-o singură celulă care a preluat unul din plasmidele recombinate. Aşadar, toate celulele unei colonii conţin acelaşi fragment ADN. Fiecare colonie corespunde unui fragment ADN şi ele nu se vor uni deşi în decursul unei nopţi la 37°C poate ajunge la 10^6 celule. Diverse fragmente ADN rămân în colonie dar se separă unele de altele. Celulele transformate conţin numeroase copii ale plasmidelor transformate (*prelucrare după Lodish şi colab., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

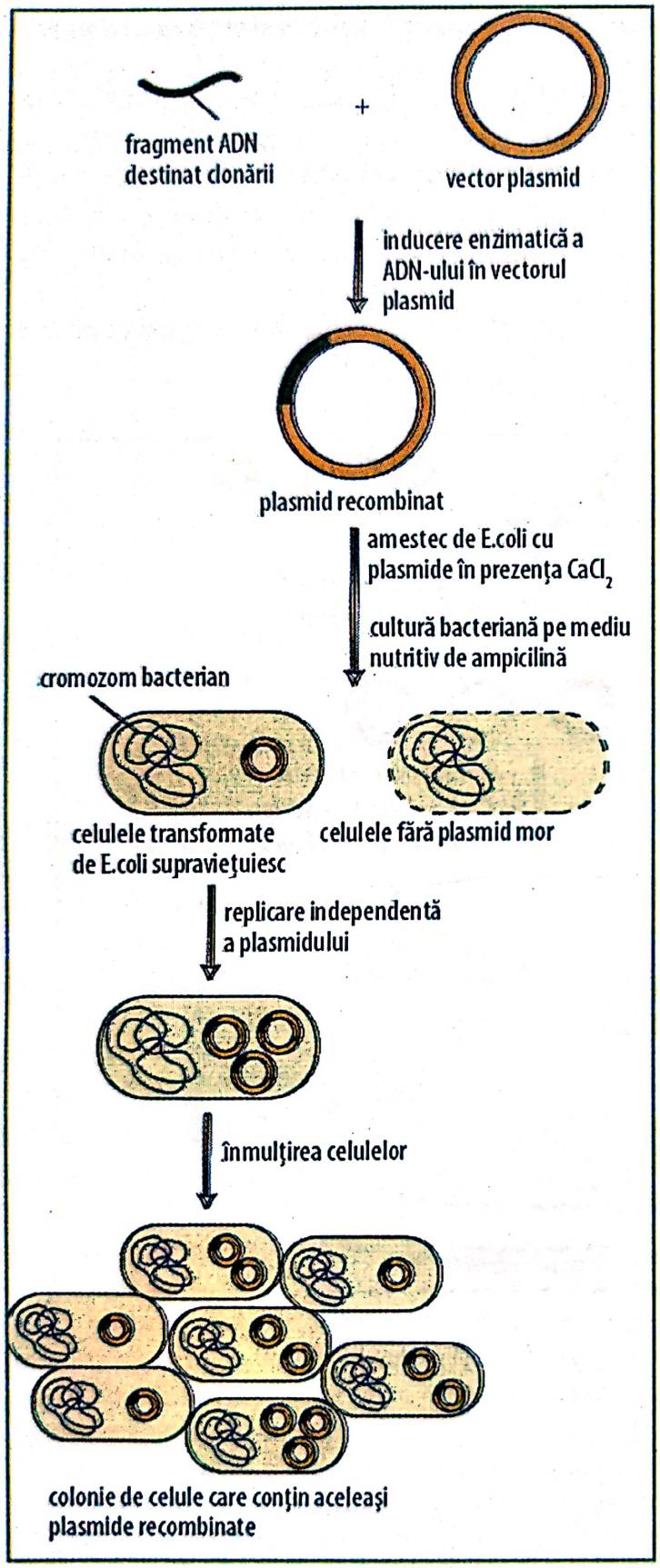


Fig. 125 – Procedeul clonării unui fragment ADN într-un vector plasmidic.
Plasmidul conține un starter pentru replicare și o genă pentru rezistența la ampicilină (prezentate însă în fig. 124). Inducerea plasmidului în celulele de *E. coli* este stimulată de o concentrație ridicată de $CaCl_2$. Chiar și în prezența lui $CaCl_2$, transformarea are loc greu și rar, puține fiind deci celulele transferate prin preluarea moleculei plasmidice.
Celulele netransformate mor într-un mediu care conține ampicilină. Dacă o celulă gazdă a preluat un plasmid, acesta va replica (se va înmulți) independent de cromozomul acestuia.
Înmulțirea celulei gazdă transformată va conduce la formarea unei colonii, iar fiecare celulă fiică va conține cel puțin o copie a plasmidului.
Prin acest procedeu s-a indus întregii colonii rezistență la ampicilină și un nou fragment-ADN care ar putea fi cel dorit de noi pentru inducerea unei alte însușiri.

Amestecul de plasmide recombinate sunt puse la incubat de celule de *E. coli* în cele mai potrivite condiții de transformare și apoi sunt cultivate în vase Petri conținând un mediu selectiv cu antibiotic.

Prin selecție se obțin colonii pornind de la o singură celulă care a preluat un singur plasmid cu fragmentul specific de ADN care a fost inițial introdus în plasmid. În felul acesta, fragmentele de ADN din amestecul inițial au fost separate unul de altul în clone bacteriene specifice.

Cu ajutorul clonării ADN este pus la dispoziția practicienilor biotehnologi un procedeu de separare a unui fragment ADN din amestecuri și fabricarea unei cantități mai mari din ADN-ul țintă pentru scopuri dorite.

Scanned with OKEN Scanner

S-au prezentat mai sus posibilitățile cele mai simple ale clonării ADN-ului și avantajele pe care le aduce. Există multe alte metode care ar trebui incluse în acest material, dar care ar depăși dimensiunile acceptate pentru această carte.

Reamintim câteva dintre ele, în ideea că cei interesați le vor găsi în literatura de specialitate:

- Crearea unor secvențe specifice de molecule ADN prin secționare cu enzime de restricție (restriction enzime).
- Fragmentele restricționate cu capete finale complementare adezive pot fi ușor fuzionabile. De ex., ADN I cu ADN II. Acest procedeu necesită prezența unor enzime specifice (tabelul 126).
- **Polilinkerul** este un plasmid recombinat care conține o secvență sintetică ce deține numeroase și diferite poziții de creare a fragmentelor restricționate. Asta înseamnă că polilinkerul conține poziții pentru mai multe clonări (fig. 127).

Tabelul 126

Câteva enzime de restricționare a fragmentelor ADN și modul de recunoaștere a secvențelor lor

Organismul	Enzima*	Locul de recunoaștere↓+	Procesarea finalului
Arthrobacter luteus	AluI	AG↓CT	neted
Bacillus amyloliquefaciens H	*Bam*HI	G↓GATCC	rugos/lipicios
Escherichia coli	*Ecor*RI	G↓AATTC	rugos/lipicios
Haemophilus gallinarum	*Hga*I	GACGC+5↓	++
Haemophilus influenzae	*Hind*III	A↓AGCTT	rugos/lipicios
Haemophilus parahaemolyticus	*Hph*I	GGTGA+8↓	++
Nocardia otiitiscaviaruns	*Not*I	GC↓GGCCGC	rugos/lipicios
Staphylococcus aureus 3A	*Sau*3AI	↓GATC	rugos/lipicios
Serratia marcesens	*Sma*I	CCC↓GGG	neted
Thermus aquaticus	*Taq*I	T↓CGA	rugos/lipicios

* Enzimele primesc prescurtarea bacteriilor de origine din care au fost izolate. Cifrele romane indică în ce poziție se află enzima pe ADN-ul sușei (de ex. *AluI* - înseamnă că enzima restrictivă a fost izolată din *Arthrobacter luteus*).

+ Secvența de recunoaștere în direcția 5'-3' este prezența sub forma unei singure benzi. Săgeata marchează locul de secționare. Enzimele care produc capete finale netede secționează amândouă benzile ADN pe locul indicat. Enzimele care produc capete finale adezive secționează pe locurile prevăzute, tăietura însă are grijă a fi efectuată pe fiecare bandă între aceleași nucleotide. Numai astfel ele pot fi din nou lipite.

++ Locul de secționare pentru HgaI și HphI este poziționat la distanță față de secvența de recunoaștere a nucleotidului. HgaI secționează după 5 nucleotide în direcția 3' sub secvența de recunoaștere GACGC pe o bandă și după 10 nucleotide în direcția 5', înainte de secvența complementară de recunoaștere, pe banda opusă: HphI secționează după 8 nucleotide în direcția 3' sub secvența de recunoaștere GGTGA într-o bandă și după 7 nucleotide în direcția 5', înainte de secvența complementară de recunoaștere TCACC, în banda opusă.

Scanned with OKEN Scanner

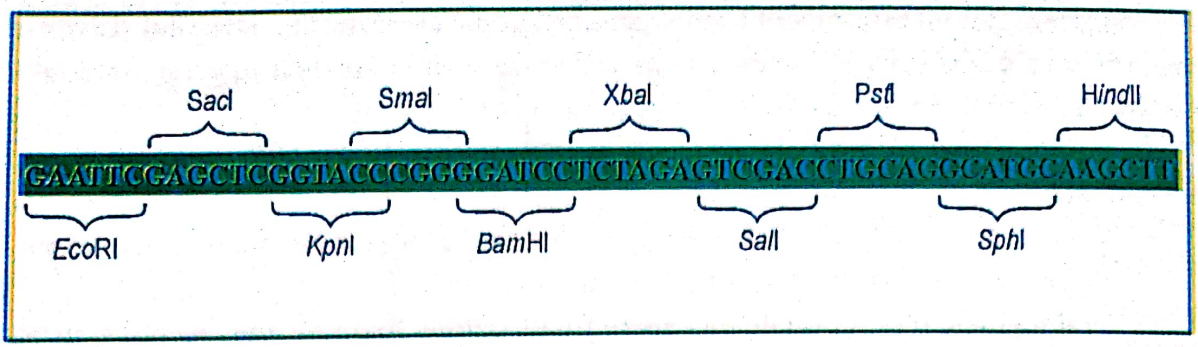


Fig. 127 – Secvenţa unui polilink.
Polilinkul serveşte la fabricarea unor plasmide recombinate cu inducţia unor fragmente de ADN-exogen. De această dată, vectorul plasmidic conţine o secvenţă care recunoaşte mai multe fragmente şi deci oferă multiple poziţii de clonare. Această secvenţă este denumită polilink. În desen sunt prezentate 10 secvenţe de recunoaştere a celor zece enzime diferite de restricţionare. Ele sunt marcate cu o acoladă şi corespund datelor din tabelul 126. Polilinkerul poate fi sintetizat chimic şi apoi introdus într-un plasmid

h) Sinteza unor molecule scurte de ADN

A devenit astăzi posibilă datorită progreselor făcute de ştiinţă. Această sinteză este posibilă astăzi pentru molecule ADN cu o singură bandă (single-stranded DNA, ssDNA) în româneşte i-am putea spune sbADN. În felul acesta se pot fabrica în laborator secvenţe dorite de ADN de până la maximum 100 nucleotide*.

ADN-ul sintetic îşi găseşte aplicarea în diferite tehnici de recombinare, fiind utilizat din ce în ce mai mult în crearea şi manipularea OMG-urilor. Moleculele complementare de sbADN (ssDNA) se lasă uşor hibridizate în aşa fel încât ele, de exemplu, conţin şi dbADN (dsDNA) cu finaluri adezive. Acest ADN cu dublă bandă apare apoi ca în cazul celor extrase din organisme vii sub formă de fragmente restricţionate şi pot fi clonate în vectorii plasmidici. ADN-ul sintetic se integrează deci ciclului natural şi se comportă ca şi când ar fi fost sintetizat natural.

În figura 128 este prezentată o experienţă în care secvenţa unui polilink sintetizat chimic este introdusă finalmente într-un vector plasmidic. El uşurează clonarea fragmentelor de ADN ce sunt fabricate de către diferite enzime de restricţie.

Acest exemplu demonstrează posibilitatea utilizării moleculelor sintetice în a introduce cele mai potrivite poziţii de restricţie a fragmentelor în secvenţa de ADN în care în mod normal şi natural nu apar.

Pe de altă parte, moleculele sintetice de ADN sunt utilizate la secvenţionarea ADN-ului şi prin aceasta la identificarea clonelor căutate. Cercetările au demonstrat, de asemenea, că în procesul de clonare al ADN-ului, secvenţele naturale de ADN se lasă relativ uşor înlocuite de către moleculele sintetice, uşurându-se aşa cum am văzut posibilitatea studierii anumitor mutaţii. ■

* Este vorba, prin sintetizare, de alăturarea într-o anumită ordine a nucleotidelor. Nu se pune încă problema sintezei nucleotidelor. Este previzibil ca şi construcţia sintetică a nucleotidelor să fie posibilă pornind de la „baze".

Scanned with OKEN Scanner

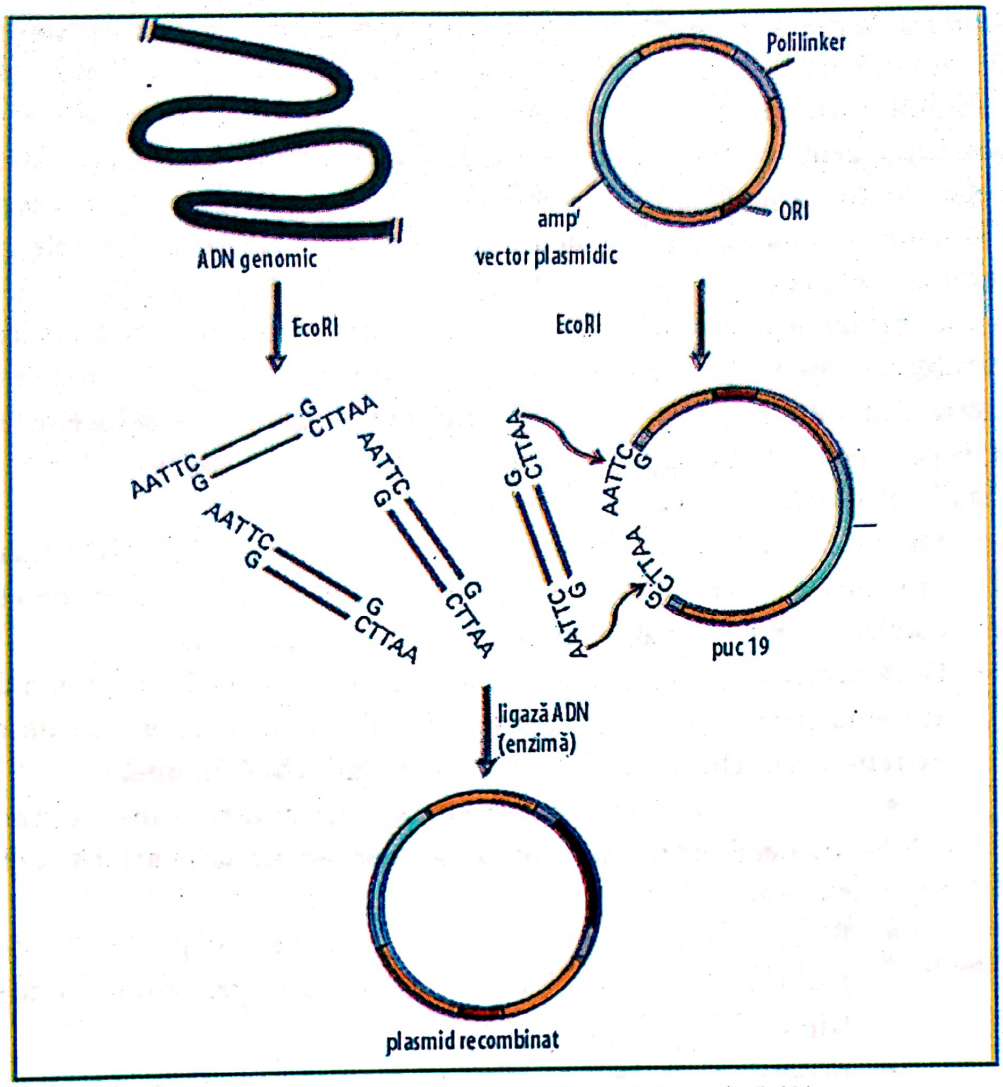


Fig. 128 – Introducerea în plasmidul recombinat a fragmentelor de restricție *E. coli* - EcORI
Introducerea fragmentelor genomice de restricție în vectorul plasmidic PUC 19 are loc cu ajutorul unei enzime de restricție pentru care există în polilinker un loc de către care enzima este recunoscută. Aceasta secționează atât molecula plasmidică cât și ADN-ul genomic, rezultând fragmente plasmidice și fragmente de restricție (mici segmente ADN). Acestea participă la formarea împreună a finalului, capătului complementar adeziv (literele de la sfârșitul liniei verzi). Condiții specifice de reacție acționează astfel încât în plasmid să fie introdus numai un singur fragment ADN (de restricție). Prin fenomenul de **legație** pozițiile segmentelor de restricție vor fi regenerate în plasmidele recombinate (*prelucrare după Lodish și colab., 2001*)

3.10. CONTROLUL MODULUI DE EXPRIMARE AL GENELOR LA BACTERII ȘI RELAȚIILE CU MEDIUL

3.10.1. Perceptele exprimării schimbului de substanțe

Modul în care poate fi manipulat îndeosebi ADN-ul liber, modul în care poate fi el recombinat și transpus acolo unde este nevoie de prezența sa, la care se adaugă mutațiile și alte procedee genetice, ajută la inducerea și conservarea unui fenomen extrem de

Scanned with OKEN Scanner

important denumit variabilitate genetică, care constituie, firește, baza teoretică și practică a selecției naturale. O selecție naturală care se poate întinde pe mai multe generații o constituie, de exemplu, creșterea unor populații de bacterii rezistente la antibiotice. Mecanismul genetic a fost explicat mai sus. Aici prezentăm modul în care exprimarea genetică controlează schimbul de substanțe pentru ca acestea să se adapteze mediului.

Revenind asupra mutațiilor, putem afirma că cel puțin o parte dintre ele apar în mod natural mai ales la procariote, dar și la unele eucariote, din necesitatea de a se apăra în fața unui mediu neprietenos, ostil, și, ca urmare, datorită dorinței de a supraviețui.

Problema care vrem însă să o tratăm în continuare este modul în care o anumită bacterie celulară care poartă o anumită moștenire genetică fixă, care determină, de fapt, specia, poate deci reacționa pentru a-și asigura supraviețuirea.

Studii efectuate pe aceeași *E. coli* au arătat următoarele:

- Mediul de viață al bacteriei este, așa cum se știa deja, tubul intestinal uman și, ca urmare, schimburile de substanțe care au loc între aceasta și mediul său se corelează strâns cu natura alimentației individului-om.
- Dacă bacteria în mediul său nu dispune de aminoacidul triptofan de care are absolută nevoie pentru a supraviețui, atunci ea reacționează de o manieră extrem de „inteligentă", specifică numai lumii vii, și anume:
  - *Activarea* unei alte căi de schimb a substanțelor prin care, pornind de la un metabolit sau altă substanță intermediară, se poate fabrica triptofanul necesar.
  - Blocarea acestei sinteze, sau mai bine zis decuplarea căii de sinteză a aminoacidului atunci când prin nutriție gazda-om, aduce suficient triptofan în traiectul digestiv.
  - Economisirea resurselor proprii de energie pe această cale și reorientarea lor spre alte căi, cum ar fi, de exemplu, creșterea populației.

Principiile termodinamicii aplicate în biologie au demonstrat deja că un schimb de substanțe, adică o transformare energetică este scumpă și, mai ales, fără rost dacă substanța necesară este deja prezentă în mediul înconjurător. Bacteriile, ca și numeroase alte ființe vii, au capacitatea de a-și modifica schimbul de substanțe, de a-și optimiza costurile energetice în funcție de schimbările din mediul înconjurător.

- Asemenea teze sunt valabile și societății umane, numai că tehnologic și social omul, cu toată inteligența lui, este departe de a se apropia de un sistem optim de reglare a sistemelor și deci a costurilor energetice.
- În lumea bacteriilor, controlul schimburilor de substanțe se face pe două niveluri, și anume:
  1. Celulele pot să-și modifice concentrația specifică de molecule enzimatice; aceasta conduce la regularizarea exprimării genelor implicate (fig. 129).
  2. Aceleași celule pot să influențeze activitatea moleculelor enzimatice deja existente.

Ultimul control neapărat necesar se bazează pe sensibilitatea anumitor enzime față de anumiți factori chimici, care pot conduce la creșterea sau scăderea activității lor catalitice.

Scanned with OKEN Scanner

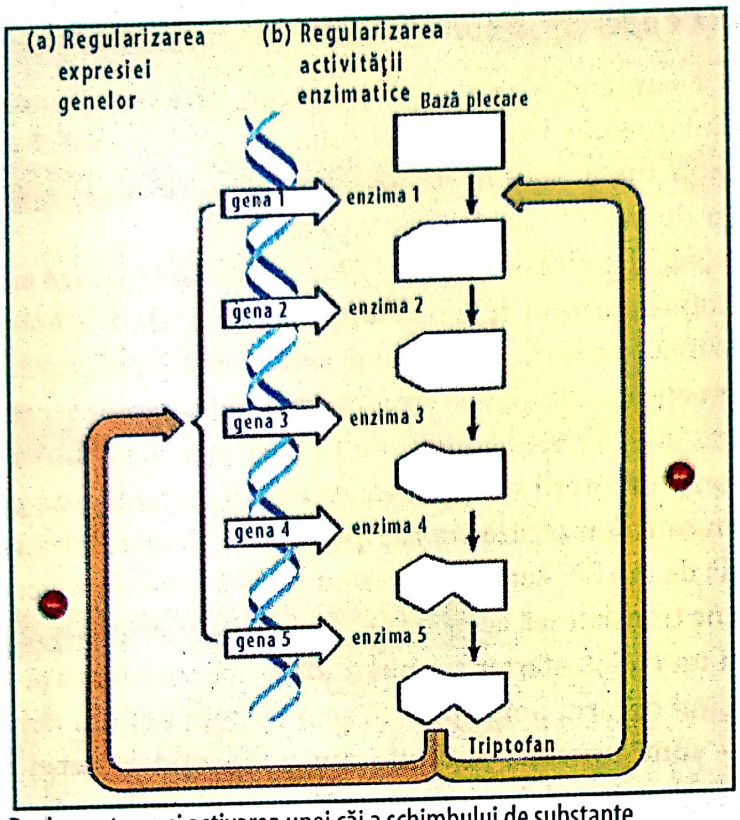


Fig. 129 – Reglementarea şi activarea unei căi a schimbului de substanţe
Prin influenţarea expresiei sau exprimării genelor, tradusă prin sinteza unor noi molecule enzimatice, celulele pot să mărească viteza şi eficacitatea anumitor modele şi căi de schimb a substanţelor. Sau pot obţine acelaşi efect prin coordonarea şi optimizarea activităţii catalitice a enzimelor deja existente în sistem. În cazul sintezei triptofanului, activitatea este blocată dacă acesta este suficient în mediu sau, dimpotrivă, activată dacă acesta lipseşte din mediu.
a) Expresia genelor pentru fabricarea enzimelor în schimbul de substanţe.
b) Activitatea primelor enzime implicate în acest sistem de schimb de substanţe.
Amândouă căile creează un feed-back - inhibitor

Activitatea primelor enzime implicate în biosinteza triptofanului este inhibată de către produsul final al acestui sistem, adică de triptofan. De aceea, biosinteza se autoblochează de îndată ce produsul final s-a acumulat în celule în concentraţia necesară. Acest fenomen poate fi denumit inhibare - feed-back sau recuplare negativă, care este tipic, firește, pentru anabolism (construcţia schimbului de substanţe), adică permite celulelor schimbări rapide ale concentraţiilor lor în diverse substanţe.

– Dacă, (revenind la exemplul nostru) mediul în care trăieşte celula livrează suficient triptofan, regularizarea genelor se derulează în felul următor:
  - Celulele blochează enzimele care catalizează fabricarea triptofanului.
  - Controlul asupra concentraţiei intracelulare a enzimelor se derulează la nivelul transcripţiei, adică al sintezei mARN-ului pentru aceste enzime. Putem spune deci că numeroase gene ale genomului bacterian prin acest statut al schimbului de substanţe pot cupla sau decupla celula în relaţia cu sistemul de schimb. Acest mecanism al controlului exprimării genelor defineşte modelul Operon, care a fost propus în 1961 de către Francois Jacob şi Jacques Monod de la Institutul Pasteur din Paris. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.10.2 Unele principii de operare ale operonului

Este deci interesant să cunoaştem ce este acest operon, care sunt principiile care-l fac operabil în controlul sintezei triptofanului folosind acelaşi model cercetat pe *E. coli*. Precizăm că în mod asemănător operează şi bacteriile care produc acidul lactic cu iaurt (este vorba doar de nuanţe care le diferenţiază).

S-a demonstrat deja prin desenul din figura 129 că *E. coli* sintetizează aminoacidul triptofan în mai multe trepte pornind de la o anumită bază (nivel). Fiecare reacţie este catalizată de către o enzimă specifică. Cele 5 gene care codifică polipeptidele acestei enzime se află foarte aproape una de alta pe cromozom. Un promotor serveşte tuturor genelor pentru formarea unei singure unităţi de transcripţie. Aşa cum s-a demonstrat în capitolul anterior, promotorii sunt cunoscute locaţii de prindere a polimerazei ARN pe ADN, locul din care demarează transcripţia genei. Urmare a transcripţiei va rezulta o lungă moleculă de mARN care va reprezenta cele 5 gene ale sintezei triptofanului. Celulele bacteriene translatează acest transcript în polipeptide separate, fiindcă mARN-ul este dotat cu un codon starter şi unul „stop" care coordonează şi semnalizează începutul şi sfârşitul fiecărui polipeptid. Şi acum câteva noţiuni noi:

Gene structurale - sunt structuri alcătuite din polipeptidele genelor codante. Activitatea lor poate fi reglementată de un singur şalter (cuplare decuplare).

Operator - reprezintă un segment de ADN care alcătuieşte şalterul şi ale cărui funcţii se manifestă în funcţie de necesităţi în cuplarea sau decuplarea sistemului de sinteză a triptofanului. Atât poziţia cât şi numele se potrivesc bine funcţiilor sale. În interiorul promotorului sau între promotor şi genele structurale se exercită controlul operatorului asupra pătrunderii polimerazei - ADN spre genele structurale.

Operon - reprezintă acest ansamblu format din promotor, operator şi gene structurale, adică întregul sistem care participă la producţia enzimelor necesare sintezei triptofanului. El este prezentat în detaliu în figura 130, schemă elaborată după modelul descoperit la *E. coli*.

TRP-Operon nu este altceva decât operonul specific descoperit prin cercetările efectuate la E. coli, trp fiind o prescurtare de la **trip**tofan. Operonul trp dar şi altele descoperite sau în curs de descoperire la alte bacterii, este, aşa cum am demonstrat, un şalter de control (on + off) sau în germană (ein + aus), poziţionat în una din cele două variante în funcţie de ceea ce doreşte să obţină, producerea sau inhibarea triptofanului.

Represor proteic - este o proteină sintetizată iniţial ca inactivă dar care, de îndată ce se cuplează la operator blochează pătrunderea enzimei ARN-polimerază în zona promotorului. Prin aceasta transcripţia genelor structurale este anihilată.

Operator + represor legat = decuplare

Operator fără represor = cuplare.

Proteinele care alcătuiesc represorul sunt absolut specifice. Ele recunosc şi se leagă numai de operatorul unui anumit operon.

Represorul care decuplează trp-operonul este fără efect la oricare alt operon prezent în genomul *E. coli*.

Scanned with OKEN Scanner

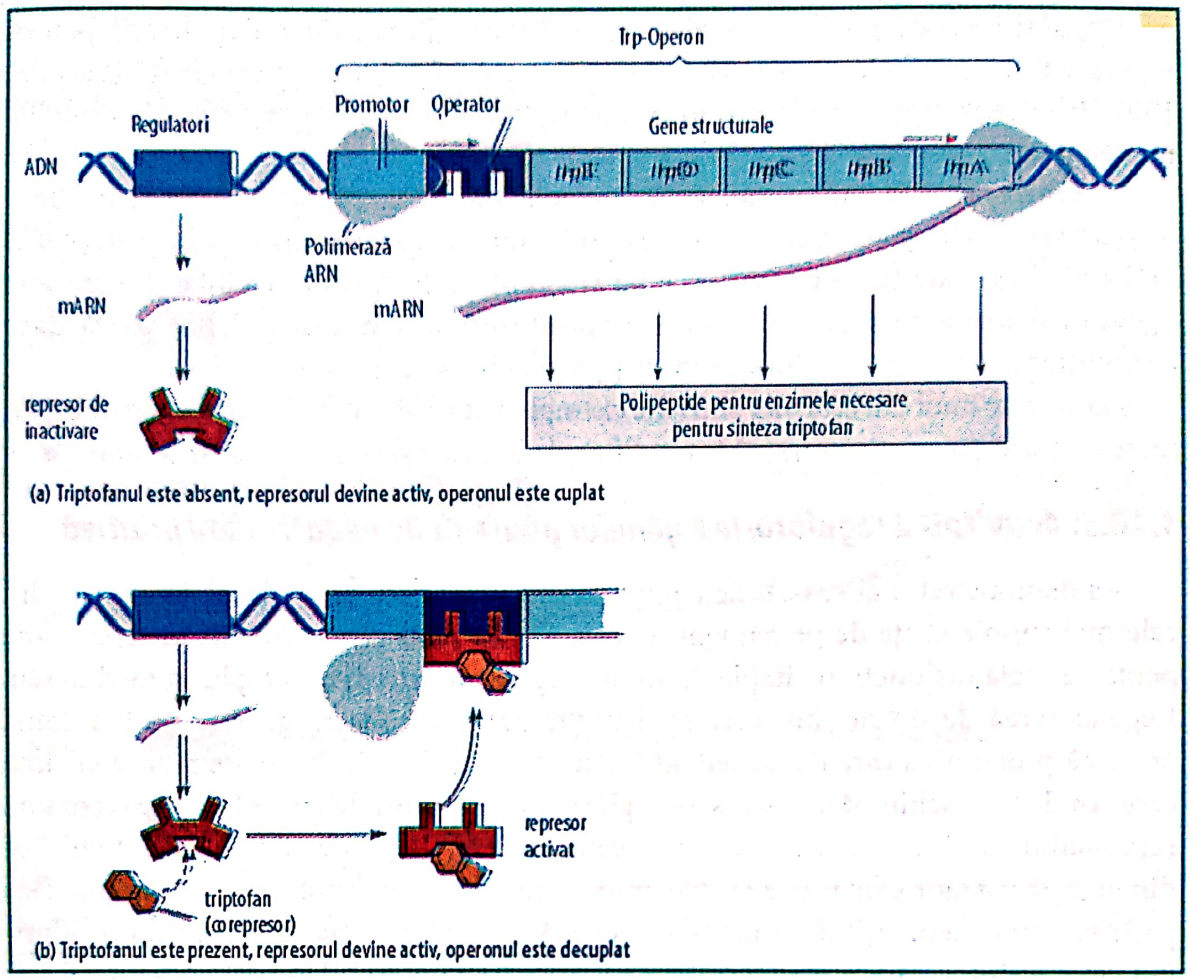


Fig. 130 – Schema unui operon trp (triptofan) - reglare prin regresie enzimatică

Procesul este împărţit didactic în două etape:

a) Triptofanul este un aminoacid foarte necesar pentru *E. coli* şi care este fabricat prin schimbul anabolic al substanţelor. Producţia lui este catalizată de către enzime reprimabile. Triptofanul este produsul final al acestui model de schimb de substanţe, iar abundenţa lui în celule inhibă sinteza acestor enzime, adică stopează producerea acidului, pentru că nu are cine cataliza procesele de biosinteză.

În prima fază este prezentat acest mecanism. Cinci gene structurale care codifică polipeptidele enzimelor modulului de sinteză sunt incluse în operon. Operonul mai conţine un promotor şi un operator. Deci operatorul se află înăuntrul promotorului, o parte din acesta este desenată în afara lui din motive de înţelgere. Dacă operatorul (un fel de şalter) este cuplat atunci enzima ARN-polimerază se leagă în zona promotorului şi transcrie structura genelor. O genă regulatorie aflată în afara operonului codifică o proteină represor. Represorul poate cupla trp-operonul prin legarea lui de operator, iar polimeraza ARN împiedică pătrunderea acestuia spre promotor. Proteina represor este sintetizată iniţial într-o formă inactivă şi este activată numai în absenţa triptofanului. Dacă represorul nu se leagă la operator, operonul rămâne cuplat şi mARN-ul produce enzimele necesare sintezei triptofanului.

b) Prin acumularea triptofanului în celule se inhibă propria lui sinteză prin activarea proteinei represor. Represorul se poate acum lega la operator, iar operonul este decuplat

(prelucrare după Campbell şi colab., 2000)

Scanned with OKEN Scanner

Regulator - este produsul unei gene cu funcţii de represor. Regulatorii pentru represorul trp se află la o anumită distanţă de operon pe care îl controlează (vezi fig. 130). Prin transcripţia regulatorului rezultă un mARN care este translatat în proteina represorului.

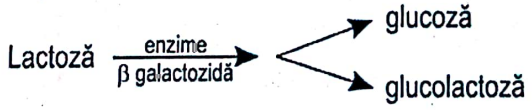
Corepresor - este o mică moleculă care colaborează cu proteina represor în decuplarea operonului. Dacă concentraţia triptofanului intracelular creşte, din ce în ce mai multe molecule de triptofan se leagă cu trp-moleculă represor, facilitând legarea la operator şi creând posibilitatea decuplării producerii de aminoacid. Dimpotrivă, dacă concentraţia acestuia se reduce, transcripţia genelor structurale reîncepe.

Acesta este unul din cele mai potrivite exemple asupra unui mod foarte rapid de exprimare a genelor, o reacţie promptă la modificările intra şi extracelulare ale mediului. ■

3.10.3. Activitatea regulatorie a genelor poate să fie negativă sau pozitivă

S-a demonstrat mai sus cât de complexă este activitatea biomoleculară a uneia din cele mai simple fiinţe de pe pământ, *E. coli*, atunci când genele trebuie să se exprime pentru a regla disfuncţionalităţile dintre un organism extrem de simplu şi mediul său. Regularizarea de tip negativ, care se dezvoltă prin exprimarea genelor nu înseamnă deloc că procesul la care dă naştere ar fi dăunător celulelor, ci numai faptul că enzima care conduce la schimbările necesare **reglării conţinutului de triptofan este o enzimă reprimabilă**, adică o activitate de tip negativ, cauzată de produsul final al sintezei. Tot din această categorie de procedee biochimice de reglare a schimbului de substanţe face parte şi sinteza „enzimelor inductibile". Acestea nu inhibă formarea produsului, ci, dimpotrivă, cu ajutorul unor mici molecule specifice îl stimulează. Un asemenea model este oferit de prezenţa dizaharidului lactoză în relaţia cu *E. coli* în traiectul intestinal cauzată de alimentaţia cu lapte a oamenilor. Lactoza este preluată de bacterie şi utilizată ca sursă de energie sau ca metaboliţi hidrogenici pentru biosinteza altor legături chimice.

Degradarea lactozei începe cu hidroliza dizaharidului în două monozaharide:



În lipsa laptelui din alimentaţie, bacteria deţine numai câteva molecule ale enzimei β-galactozidă. Dacă lactoza apare în mediul de nutriţie, bacteria îşi sporeşte numărul de molecule de β-galactozidă din celulă de peste 1000 ori în 15 minute.

Pentru acest lucru există o genă care coordonează totul şi care se numeşte lac-operon (lac - de la lactoză) şi care constituie o parte a operonului. Pentru a crea operonul în întregimea şi complexitatea sa, se mai adaugă alte două structuri genetice pentru proteinele implicate în schimburile provocate de lactoză. În continuare mai precizăm doar faptul că întreg controlul unităţii de transcripţie se face de un singur operator şi un promotor, schema prezentată în figura 131 fiind asemănătoare cu cea din figura 130. Deosebirea marcantă a celor două procedee constă în aceea că trp-represorul iniţial era inactiv şi avea nevoie de compresorul triptofan pentru a se lega de operator, în timp ce lac-represorul se activează prin el însuşi şi pentru el, se leagă de operator şi decuplează lac-operonul.

Scanned with OKEN Scanner

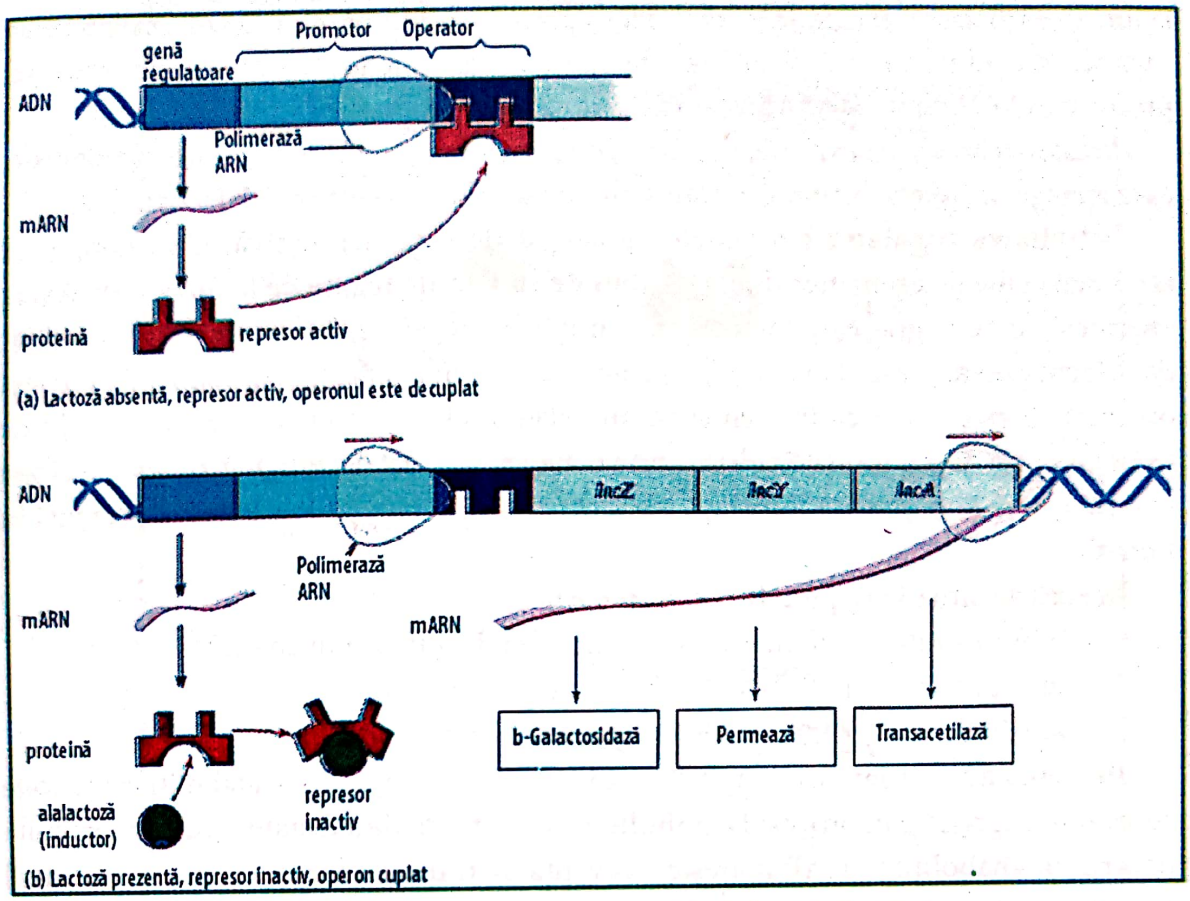


Fig. 131 – Activitatea regulatorie a genelor prin folosirea enzimelor inductibile (prin inducerea unor enzime specifice) - cazul lac-operon

Pentru preluarea lactozei şi utilizarea în schimbul energetic E. coli deţine 3 enzime. Genele structurale ale acestora sunt adunate într-un operon (operon-lac). O genă (lacZ) codifică enzima β-galactozidază care hidrolizează lactoza în glucoză şi galactoză. O a doua genă lacY codifică o permează, adică o proteină membranoasă care transportă lactoza în celulă. O a treia genă, lacA codifică enzima transacetilază a cărei importanţă în schimburile de substanţe legate de lactoză este încă neclară. Gena care răspunde de lac-represor iniţiază pe lac-operon, o situaţie neobişnuită care se derulează în 2 etape:

a) Lac-represorul este activ şi în absenţa lactozei blochează prin legarea sa la operator, lac-operonal.

b) Alalactoza, un izomer al lactozei, eliberează, descătuşează operonul prin inactivarea represorului. În felul acesta este indusă formarea enzimelor care se ocupă de schimbul de substanţe legate de lactoză.

Repetăm deci: dacă se compară enzimele reprimabile cu cele inductibile, amândouă sistemele au un important punct comun. Cele două sisteme reprezintă exemple clasice demonstrate ştiinţific pentru „controlul negativ al genelor" deoarece operonii sunt decuplaţi de către formele active ale proteinelor represor *(Campbell şi colab., 2003)*

Inductorul este în acest caz o mică moleculă care inactivează represorul. Acest inductor este în cazul lac-operonului un izomer al lactozei denumit **„alalactoză"** care se formează în cantităţi mici atunci când aceasta este preluată de celule. În absenţa lactozei, lac-represorul se află într-o conformaţie activă, iar genele structurale ale lac-operonului sunt mute, inactive. Apariţia lactozei în mediu şi accesarea ei de către bacterie conduce

Scanned with OKEN Scanner

la formarea alalactozei care se leagă de lac-represor şi schimbă această conformaţie prin care represorul nu se mai poate lega de operator. În funcţie de necesar, lac-operonul produce mARN pentru fabricarea enzimelor care degradează lactoza.

Acest mecanism de expresie regulatorie a genelor necesită enzime care sunt induse, care apar prin sinteză, urmare a unui semnal chimic (în acest caz alalactoza).

Activitatea regulatorie a genelor poate să fie însă şi **pozitivă**. Un exemplu în acest sens vine de asemenea din **schimbul de substanţe legate de lactoză**. Fabricarea enzimelor care degradează lactoza, în cantităţile necesare, nu se poate realiza chiar dacă lactoza este prezentă în concentraţile necesare în celule. O altă condiţie a reuşitei operaţiunii este aceea ca în celulă să nu existe nici o moleculă de zahăr simplu de tipul glucozei. Dacă totuşi *E.coli* dispune o alegere a substratului pentru glicoliză sau alte căi de schimb, preferă totuşi glucoza, care în mod obişnuit este foarte prezentă în nutriţie.

În această situaţie se pun, firesc, întrebările:

- Cum se simte *E. coli* în lipsa concentraţiei de glucoză în celulă?
- Cum este transmisă această informaţie genomului?

Răspunsul constă tot într-o proteină, şi anume:

Proteina activatoare a catabolismului (CAP - din engleză). Cataboliţii sunt acele substanţe degradate în procesul **catabolic** al schimbului de substanţe, adică reprezintă contrariul anaboliţilor. CAP măreşte frecvenţa de transcriere a operonului, cum ar fi lac-operonul prin legarea acesteia de promotor. Acest cuplu promotor - CAP facilitează formarea polimerazei ARN.

Procedeul acesta **este unul pozitiv** deoarece CAP se leagă direct de ADN şi prin aceasta stimulează manifestarea expresiei genei având deci loc o **regularizare pozitivă a expresiei genei**. Acest model este prezentat în figura 132. Activitatea CAP se corelează cu concentraţia în glucoză a celulei.

Am rămas dator cititorului nostru cu încă o noţiune, şi anume:

AMP ciclic (cAMP) este o moleculă derivat a ATP-ului (adenin-trifosfatului cu rol de reglare energetică a funcţionării sistemului discutat). De fapt, cAMP-ul nu acţionează singur, ci neapărat în complex cu CAP care se cuplează la lac-promotor în scopul stimulării transcripţiei genelor care codifică şi realizează schimbul de substanţe în care este implicată lactoza.

Am prezentat aceste modele prin care genele îşi exprimă funcţionalitatea în relaţia cu mediul, pentru a demonstra, pe de o parte, cât de complexe sunt din punct de vedere biochimic modificările de care au nevoie celulele pentru a se adapta la mediu şi cât de rapid trebuie să se desfăşoare acestea.

În timp ce dumneavoastră citiţi aceste rânduri, în tubul dumneavoastră digestiv *E. coli* a derulat deja milioane de reacţii care să o poziţioneze în situaţia de a rezista oricărui fel de meniu sau medicamente utilizate. Să nu uităm însă că la baza tehnologiilor genetice stau cu siguranţă aceste cunoştinţe, la care se adaugă şi cele mai complexe prezente în lumea eucariotelor. Despre acestea vom vorbi în continuare.

Scanned with OKEN Scanner

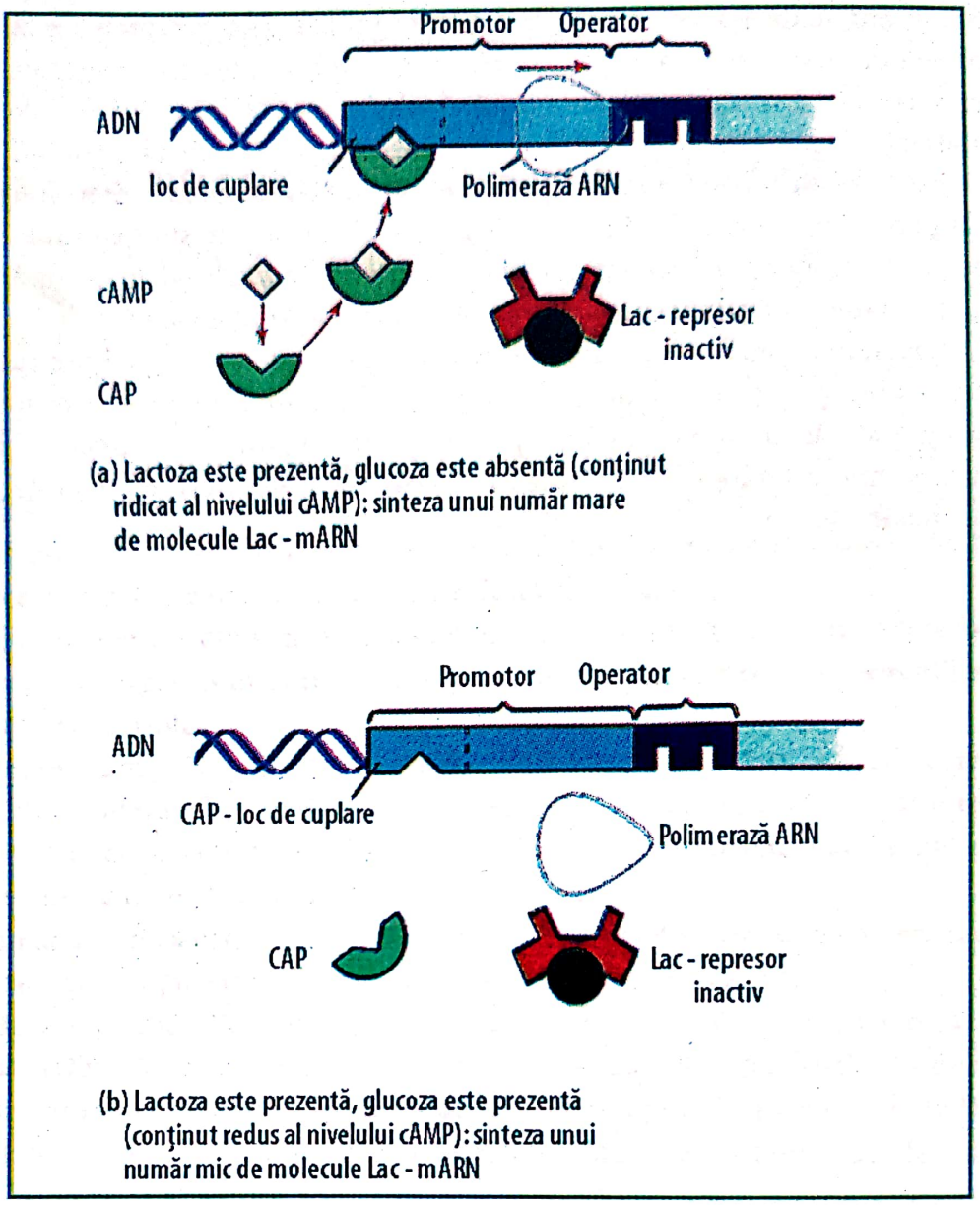


Fig. 132 – Controlul pozitiv al expresiei genei.

Se realizează de către o proteină activator catalitic. Sistemul este valabil nu numai pentru lac-operon ci, dimpotrivă, CAP acţionează astfel ca proteine represor şi pentru alte numeroase operoane. Polimeraza ARN are în acest caz o afinitate redusă pentru promotorul lac-operonului. Această afinitate poate fi crescută, respectiv normalizată, de către o proteină activator catabolitic (CAP) care se leagă de ADN. Cuplarea moleculelor CAP nu este oricum posibilă ci numai dacă acestea sunt cuplate, cu AMP-ul ciclic (Camp), a căror concentraţie în celule este invers proporţională cu concentraţia în glucoză. Cele două situaţii prezentate mai sus sunt deci următoarele:

a) Dacă glucoza se află în cantitate redusă cAMP-ul activează AMP-ul şi lac-operonul produce din abundenţă mARN pentru degradarea lactozei.

b) Dacă există suficientă glucoză în mediu, concentraţia de cAMP este redusă, transmiţând CAP-ului informaţia de a nu stimula transcripţia. De aceea, celulele preferă glucoza în schimburile de substanţe şi pentru aceasta vor avea grijă să utilizeze în permanenţă enzimele, chiar dacă lactoza este disponibilă. Prin acest model de regularizare a schimbului de substanţe, *E. coli* va produce enzime pentru degradarea lactozei numai şi numai dacă glucoza nu este disponibilă (*prelucrare după Lodish şi colab., 2003; Campbell şi colab., 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

Să nu uităm, de asemenea, că OMG-urile ca rezultat, ca produse ale biotehnologiilor au nevoie de o permanentă corelare cu mediul în care cresc, altminteri nu sunt utile. Bacteriile şi virusurile ajută la inducerea genelor care să asigure în permenență flexibilitatea organismelor şi modelarea lor după cursul vremii, al mediului.

Genetica moleculară s-a preocupat îndeosebi de clarificarea mecanismelor genetice la procariote, virusuri şi bacterii. Organismele eucariote sunt cu mult mai complexe, iar cercetătorii au început numai de puțini ani să înțeleagă în ce măsură şi cum poate fi condus controlul expresiei genelor în această complexitate.

O cercetare de mare proporții încearcă să explice azi, şi reuşeşte pas cu pas, cum poate, de exemplu, genomul uman să coordoneze într-un zigot uman, firește, întreaga dezvoltare a atât de numeroaselor tipuri de celule. Înainte de a trece la elaborarea tehnicilor micro-biologice este necesar să asimilăm şi câteva cunoştințe din zona eucariotelor. ■

Scanned with OKEN Scanner

4. EXPRIMAREA GENELOR LA EUCARIOTE. MODELE DE ORGANIZARE A GENOMULUI

4.1. PARTICULARITĂȚI ALE GENOMULUI LA EUCARIOTE

S-a demonstrat în capitolul anterior că exprimarea genelor în derularea activității biochimice ca și cea a transmiterii caracterelor, nu trebuie să fie întâmplătoare, ci tot timpul controlată. Acest control se efectuează nu numai la procariote, ci și la eucariote, unde procesele de exprimare și control sunt cu mult mai complicate. Diferența o face, de regulă, mărimea genomului care:

- Este cu mult mai mare la eucariote. Numărul de gene la specia umană a fost stabilit recent la cca 40.000. Până în anul 2000 se vorbea de un număr de gene care oscila între 50.000 și 100.000. Putem spune azi că genomul uman conține de cel puțin 40 de ori mai multe gene decât al bacteriilor.
- Celulele la eucariote sunt foarte numeroase și cu funcții diferite. Acest lucru complică foarte mult activitatea sistemului de prelucrare a informațiilor la celulele eucariote.
- Genomul uman ca și al altor eucariote dețin o mare cantitate de ADN care nu codifică sinteza ARN-ului sau a unei proteine. După cum s-a observat într-un capitol anterior, această masă de ADN trebuie ca la fiecare ciclu de înmulțire al celulelor să fie replicat exact, practic fără greșeli.
- Numai mărimea cantității de ADN, numai acest factor deci solicită genomului eucariotic o organizare cu mult mai complexă ca la procariote.
- Atât la pro- cât și la eucariote ADN-ul este asociat proteinelor. La eucariote însă ADN-proteine este denumit cromatină și este pliat și ambalat în diferite suprastructuri. Fotografiile efectuate la microscopul electronic (fig. 133) ne lasă o idee asupra complexității organizării unui cromozom în celulele unui embrion de salamandră.

REȚINEȚI **La eucariote numai o parte - de regulă foarte mică - a genomului celulei este liber pentru a se exprima.**

Faptul că eucariotele sunt organisme complexe, cele mai multe pluriorganice și deci diferențiat pluricelulare, face ca, deși celulele conțin în genomul lor întreaga moștenire genetică a unui fenotip, specializarea lor pe funcții să conducă la necesitatea ca numai un număr redus de gene să se exprime, în primul rând acelea care trebuie să ducă la bună îndeplinire funcțiile organului respectiv.

În aceste condiții exprimarea genelor trebuie să răspundă la semnalele interne și externe pozitiv sau negativ, cuplare sau decuplare. Complexitatea organelor și specializarea funcțională solicită un timp de control (al exprimării genelor) mai lung, corelat și coordonat cu diferențierea celulelor.

Scanned with OKEN Scanner

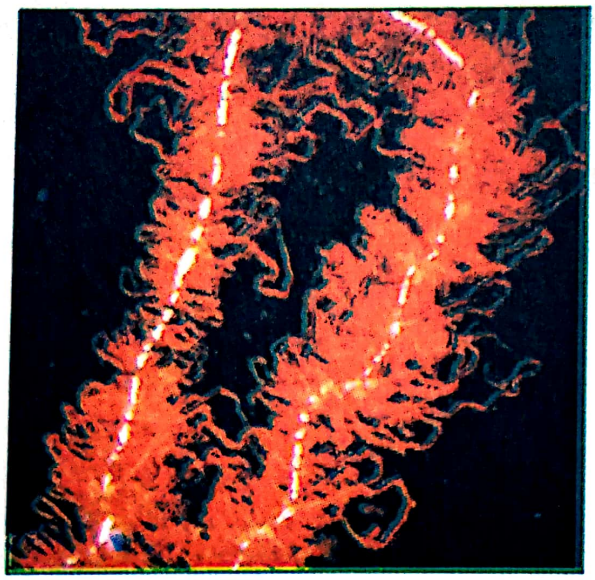


Fig. 133 – Cromozomul unei celule din embrionul unei salamandre. Cele două benzi colorate în roşu reprezintă cromatinele active în transcripţie, diferenţiate una de alta. Benzile albe reprezintă cromatina cromatidelor împachetate dens (*fotografie la microscopul electronic - după Campbell A. Neil, 2000*)

Celulele foarte specializate cum ar fi cele nervoase sau cele hepatice care transcriu ADN-ul trebuie să fie depozitată în momentul potrivit pe gena potrivită. Este ca şi cum ai căuta un ac în carul cu fân şi nu numai că el trebuie găsit în timp util, dar şi cusătura trebuie făcută la momentul potrivit.

Dacă exprimarea genelor dă greş rezultă disfuncţionalităţi extrem de grave care în final conduc la apariţia unor boli, inclusiv a cancerului. Din aceste motive, problema reglementării activităţii genelor la eucariote este de o importanţă imensă atât pentru cercetare în domeniul medicinii cât şi pentru cercetarea de bază în domeniul biologiei moleculare.

Acum circa 20 de ani înţelegerea controlului exprimării genelor la eucariote era considerată încă o utopie. Între timp cercetătorii de specialitate au dezvoltat metode atât de fine, încât astăzi sunt în măsură să pună la dispoziţia practicii cele mai „intime" secrete ale acestui preţios fenomen. Dotaţi cu tehnologiile ADN de clonare a genelor şi cu metode din ce în ce mai rapide de secvenţionare a ADN, cercetătorii biologi au cercetat şi descoperit foarte multe detalii ale organizării şi exprimării genomului la eucariote. Aceste cunoştinţe stau la baza tehnicilor genetice pe care le prezentăm în capitolul viitor şi care constituie subiectul de bază al acestei cărţi. ■

4.2. ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A CROMATINEI CONTROLEAZĂ EXPRIMAREA GENELOR

Există un lucru comun la pro- şi eucariote, şi anume acela că materialul genetic de bază, cel care asigură transmiterea însuşirilor în descendenţă este construit sub formă de dublu bandă ADN. Genoamele sunt totuşi foarte diferit organizate, şi anume:

Scanned with OKEN Scanner

- ADN-ul procariotic este de regulă circular, iar cromozomul este atât de mic încât de abia poate fi văzut la microscopul electronic. Cromozomul lui *E. coli* constă de exemplu numai din 4,3 x 10^6 perechi de nucleotide. Adeseori este asociat cu diferite proteine, însă în general este vorba numai de puţine molecule proteice.
- ADN-ul eucariotelor alcătuieşte **cromatina**, care de această dată este legată de un mare număr şi o mare cantitate de proteine. Pe de altă parte, cromatina este într-o continuă transformare. În interfază, cromatina se prezintă sub formă de fibre obişnuite aşezate comod şi foarte vizibile. Dacă celula este colorată, cromatina apare ca o masă difuză (vezi capitolul 1). Aşa cum s-a arătat deja, cromatina unei celule care se pregăteşte de mitoză formează un număr definit de cromozomi scurţi, groşi şi discreţi.
- După colorare la microscopul electronic ei se diferenţiază foarte clar (vezi pag. 46). Cromozomul eucariotelor conţine o enormă cantitate de ADN deşi lungimea lor nu ar lăsa să se întrevadă acest lucru.
- Fiecare cromozom deţine o singură moleculă de ADN - dublu-elicoidal, neîntreruptă, care la om are o lungime de 2 x 10^8 nucleotide. Dacă ar fi desfăşurată molecula de ADN a cromozomului uman, ar ocupa o lungime de 6 cm, adică de 1000 de ori mai mare decât diametrul unui nucleu celular. Cei 46 de cromozomi ai omului, desfăşuraţi ar ocupa o lungime de circa 1000 cm (10 m). Cu toate acestea, ei încap în nucleul celulei mulţumită unei împachetări de precizie efectuată în mai multe faze. ■

4.2.1. Nucleosomii sunt numiţi „perle" ale şnurului ADN

În efectuarea împachetării există o anumită ordine şi mai ales o serie întreagă de biosubstanţe cu funcţii exacte în derularea organizării structurale a cromatinei. La primul nivel al acestei organizări se află **histonele**. Ele sunt proteine specifice însărcinate cu începerea procesului de împachetare. Cantitatea de histone este relativ egală cu cantitatea de ADN din cromatină.

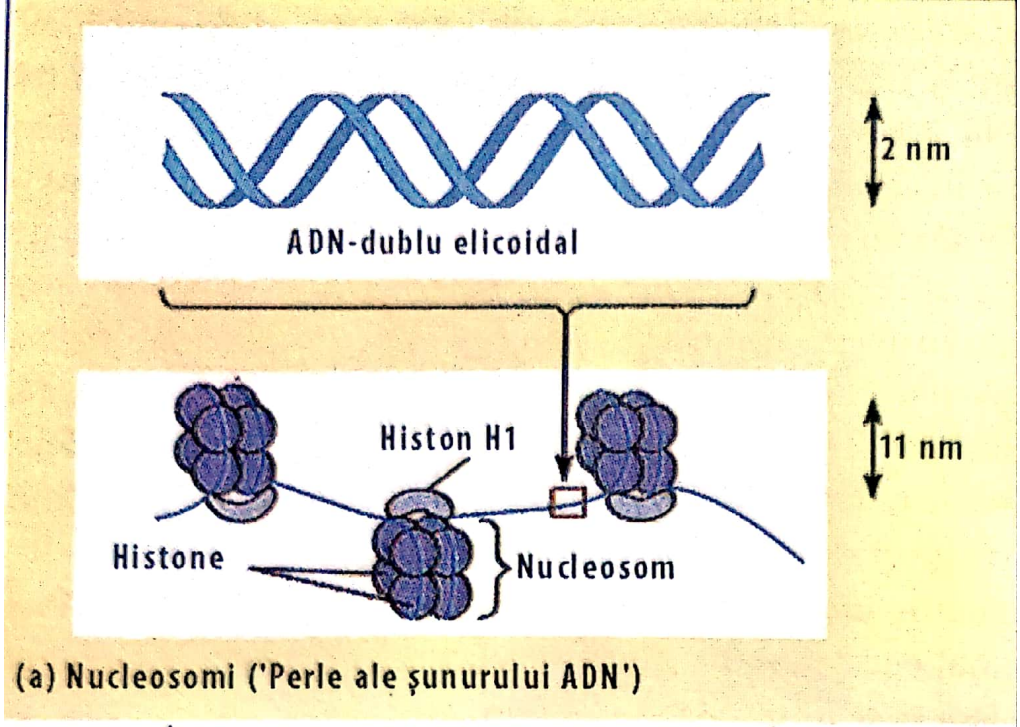
Histonele, la rândul lor, deţin un conţinut ridicat de aminoacizi încărcaţi pozitiv (lizină şi arginină). Aceştia se leagă strâns de ADN-ul încărcat negativ şi în felul acesta stabilizează cromatina (fig. 134b).

La cele mai multe eucariote se întâlnesc cinci tipuri de histone. Ele sunt foarte asemănătoare la diferitele specii de eucariote - genele histonei având un comportament foarte conservativ de-a lungul evoluţiei.

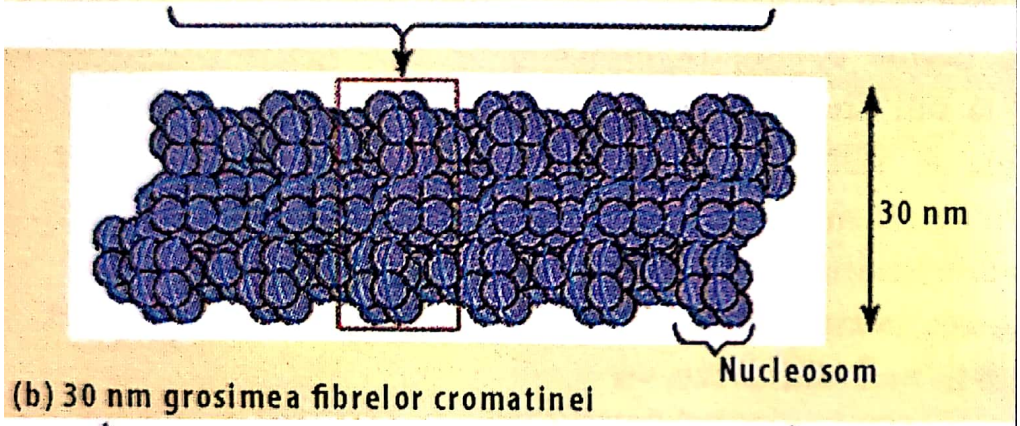
La microscopul electronic se observă că prin depliere, cromatina formează un lanţ de perle (fig. 134a). Fiecare perlă este un nucleosom, adică unitatea de bază a concentrării şi împachetării ADN-ului.

Nucleosomul este alcătuit din ADN şi asemănător firelor unei bobine - este înfăşurat formând un nucleu proteic. Acesta conţine câte 2 molecule pentru următoarele tipuri de histone: H2A, H2B, H3, şi H4 care împreună cu nucleosomii (2 pentru fiecare histonă care îi leagă) alcătuiesc un octomer. Cea de-a 5-a moleculă histonică H1 este cuplată de partea exterioară a perlei formând un complex denumit cromatosom.

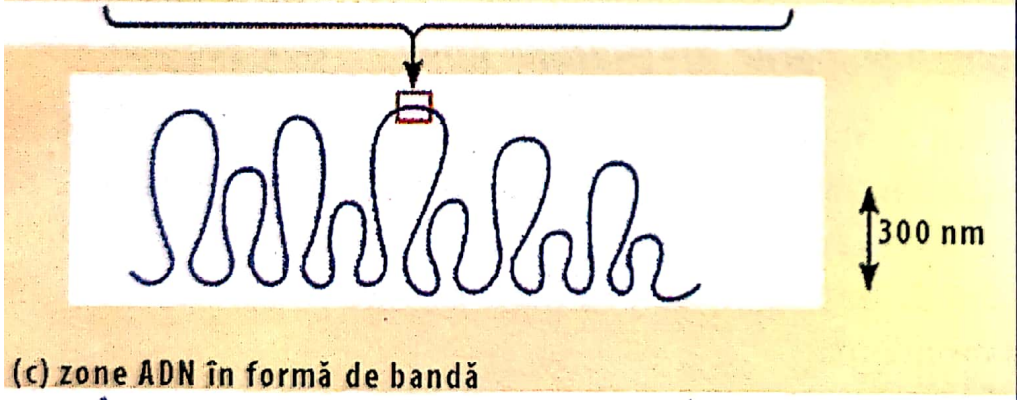
Scanned with OKEN Scanner



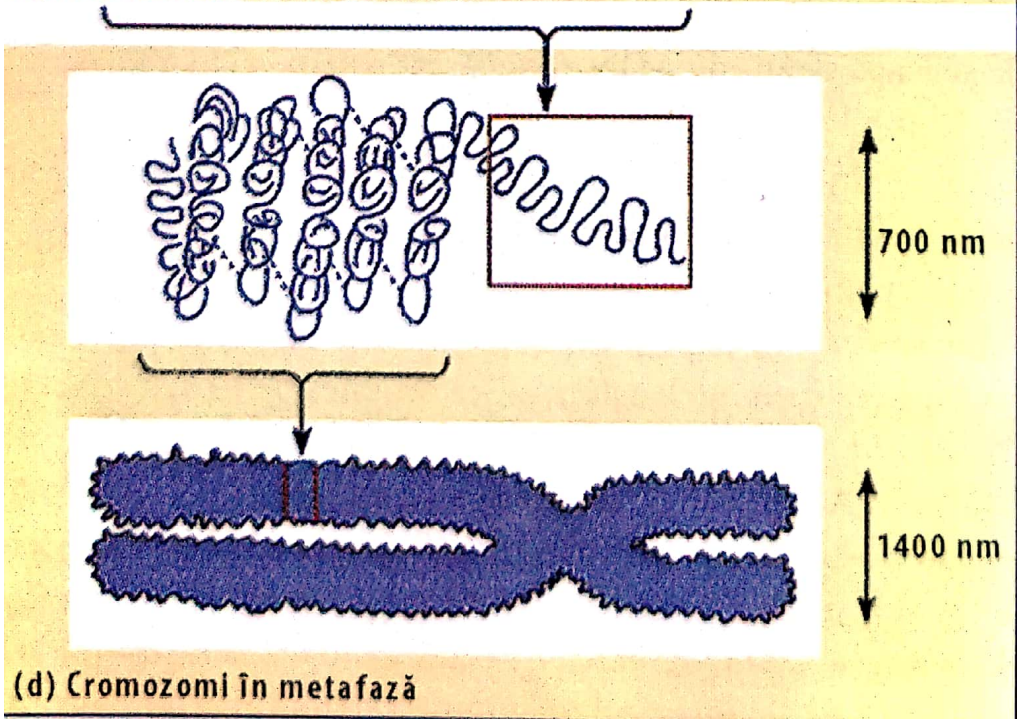
(a) Nucleosomi ('Perle ale șunurului ADN')



(b) 30 nm grosimea fibrelor cromatinei



(c) zone ADN în formă de bandă



(d) Cromozomi în metafază

Scanned with OKEN Scanner

Denumire	Masă moleculară relativă	Lizină+Arginină (mol %)	Modificări *	De remarcat
H1	22,000-24,000	28,6	Ph, Ac	Foarte bogată în lizină, lipseşte în hifele ciupercilor
H2A (H2a)	14,000	20,2	Ph, Ac, ADP-R	Bogată în lizină
H2B (H2b)	13,800	21,6	Ac	Bogată în lizină
H3	15,300	23,0	Ac	Bogată în arginină
H4	11,300	23,5	Ac	Bogată în arginină

Fig. 134b – Histonele sunt alcătuite din clase
* Ph = Fosforilarea (grupelor OH ale serinei şi treoninei)
Ac = Acetilarea (ε - aminogrupelor lizinei)
ADP-R = Ribosilizarea adenin-difosfolică (resturi ale acidului glutaminic)
(Lexicon der Biologie – 2004)

Vom vedea că în această organizare specifică a ADN-ului în nucleosomi va influenţa semnificativ exprimarea genelor. Nucleosomii conduc la o limitare a accesibilităţii ADN-ului pentru proteinele transcripţiei.

Pe de altă parte, ei pot dirija formarea unor proteine specifice pentru obţinerea unor segmente de ADN, fenomen extrem de important în tehnologiile genetice. ■

4.2.2. Procesul de ambalare – împachetare a ADN-ului – model de entropie redusă (adică ordine superioară)

„Reţeaua de perle" este prima care se implică în a face ordine în modelul foarte fin al împachetării. Trebuie remarcat în primul rând felul în care cromatinele împletite ale interfazei se adună şi se pliază pentru ca în final să formeze acel cromozom compact pe care îl vedem în timpul mitozei.

Experienţele de laborator au demonstrat că, cu ajutorul histonelor H1, „lanţul de perle" se poate plia foarte puternic, conducând la formarea unui cilindru concav (gol) de 30 nm diametru. După modelul **solenordei** (de la grecescul **solen** pentru tub) nucleosomii se ordonează în formă de spirală cu 6 nucleosomi pe circumvoluţia spiralei în partea exterioară (pereţi exteriori) şi 6 histone H1 ca „liant interior".

Aceste fibre de cromatină groase de 30 nm formează un fel de benzi denumite „domenii". În interiorul nucleului ele sunt ancorate la un „eşafodaj cromozomal" format din proteine nehistonice.

Într-un cromozom mitotic acestea se pot în continuare aglomera şi plia, după modele şi proceduri bine stabilite până ce fiecare cromatină ajunge cu un „pachet" extrem de dens, care are caracteristicile unui cromozom în metafază (fig. 135).

Deşi în general cromatina în interfază este mult mai puţin condensată prin comparaţie cu cromozomul mitotic, ea demonstrează chiar şi în această fază un anumit nivel de pliere.

În mod obişnuit, lanţul de perle format din fibre spiralate gros de numai 30 nm indică aşa cum se vede în figura 134a formarea unor benzi clare. Există, pe de altă parte şi cercetări care susţin că aceste benzi în interfază sunt fixate într-o ordine bine

Scanned with OKEN Scanner

definită prin intermediul rețelei laminei nucleare, de partea interioară a membranei nucleare. Cercetări recente demonstrează că cromatina fiecărui cromozom ocupă o zonă foarte bine definită în nucleu. Prin aceasta, fibrele de cromatină ale diferiților cromozomi nu se întâlnesc, nu se întrepătrund.

În numeroase celule, anumite zone cromozomale se mențin într-o formă înalt condensată chiar și în timpul interfazei (fig. 134a ultima poziție). Această cromatină de interfază vizibilă la microscopul electronic a fost denumită **heterocromatină**. Ea se deosebește de formele mai puțin compacte denumite **eucromatine** (de la grecescul *eu* - pentru real, adevărat). Funcțiile acestei selecții ale „condensării" cromatinei încep să fie desluşite.

1) Heterocromatina poate să exercite un control global și grob al exprimării genelor, căci așa cum ne este cunoscut, ADN-ul în heterocromatină nu este transcriptibil.
2) Un exemplu marcant îl constituie corpusculele - Barr (organite obținute din condensarea cromozomilor inactivi). Cromozomii „X" la bărbați nu se vor exprima. În schimb, „3X" va forma 2 corpusculi, cu toate acestea, o anumită zonă a cromozomului rămâne activă. Se spune că, corpusculii Barr vor fi „reactivați" dacă celulele în cauză intră în meioză și formează gameți. Cazul este prezent la mamifere și a fost atent studiat la pisici. Corpusculii au fost găsiți și sunt prezenți în celule sexuale feminine (1 corpuscul) sau, așa cum am spus, la masculii umani 3X cu 2 corpusculi. ■

4.3. MATERIALUL GENETIC INERT DIN GENOMUL EUCARIOTELOR NU CODIFICĂ DUPLICAREA GENELOR

După ce am afirmat că materialul genetic a fost creat pentru a se înmulți, duplica și transmite caracterele în descendență, iată că ultimile cercetări demonstrează că numai o mică parte din acesta intră în derulare pe căile mai vechi cunoscute. Masa principală a ADN-ului eucariotelor nu codifică nimic.

Acest fenomen este un alt punct de diferențiere între pro și eucariote căci la primele cea mai mare parte a ADN-ului genomului codifică trecând ușor prin mARN pentru proteine ca și tARN sau rARN. Numai o mică parte din mARN-ul procariotelor nu codifică și aceasta se află în promotori. Secvențele de nucleodite codate se extind fără întrerupere de la începutul până la sfârșitul unei gene. Acest lucru nu se mai întâmplă la eucariote.

Calcule recente arată că **numai 2-3%** din genomul uman este format din ADN care codifică. O mare parte a genomului eucariotelor este format din segmente ADN în copii multiple. Să ne amintim de faptul că cercetarea a vorbit inițial de un număr de gene la om care depășea 150.000, apoi 50.000 - 100.000 pentru ca azi aceiași cercetători să vorbească de circa 40.000. Ei au demonstrat că diferența a reprezentat multiple copii ale aceloraşi gene. Pe de altă parte, așa cum am văzut mai sus, secvențele care codifică pot fi întrerupte de lungi segmente de ADN care nu codifică - de tipul intronilor. Această temă a repetitivității materialului genetic va fi tratată în continuare.

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1. Secvențe repetitive

S-a demonstrat de curând că 25% din ADN total al unei eucariote pluricelulare este alcătuit din scurte module secvenționale (cel mai frecvent în lungime este 5-10 nucleotide) care sunt copiate în mii sau chiar milioane de exemplare. Componenta nucleotidică a acestor foarte numeroase copii ale secvențelor se deosebesc foarte mult de restul ADN-ului prin aceea că acest ADN repetitiv are o altă densitate.

Ca urmare, microbiologii au putut și pot să le izoleze printr-o centrifugare diferențiată. Tot ei, cercetătorii au denumit acest ADN ca ADN-satelit, deoarece el se separă ca o „bandă satelit" în tubulețele de centrifugare. ADN-ul satelit se află în cromozomi cel mai frecvent în extreme și în centromer.

Deși există informații teoretice cum că ADN-ul satelit ar fi în măsură să participe la replicarea cromozomilor sau la separarea cromatidelor, cercetătorii nu au reușit să demonstreze acest lucru prin studiile de laborator. Există totuși unele rezultate conform cărora unele secvențe satelit poziționate pe extremele cromozomilor denumite **telomere** ar avea o importanță în replicarea ADN-ului. Acest lucru a fost însă prezentat în figura 49 și nu vom reveni asupra lui.

Telomerii cromozomilor umani dețin de exemplu între 250 și 1500 repetiții (copii) ale secvențelor de baze TTAGGG (AATCCC - pe banda complementară). Un complex specific ARN-proteine denumit telomeraze adaugă în permanență secvențe repetitive la extremele moleculelor de ADN.

În același timp, telomerii împiedică cuplarea, legarea cromozomilor unul de altul și protejează extremele cromozomilor de un atac al nucleazelor. În experiența de laborator s-a constatat de exemplu că înlăturarea telomerilor la cromozomii drojdiei de bere (ciupercă), a condus la degradarea enzimatică a cromozomilor în cauză. ■

4.3.1.1. Alte secvențe repetititive în genomul eucariotelor

Unele dintre ele sunt reprezentate de **transposomi**, despre care s-a vorbit în capitolul anterior. În principiu, se poate spune că transposomii reprezintă secvențe ADN lipsite de funcții. La eucariote, transposomii sunt cotați ca inductorii unor serii întregi de boli de natură neurofibromatoasă și a diferitelor forme de cancer.

Anumite gene poartă în mod normal secvențe repetitive la extremitățile lor. Prin mutații, numărul de copii poate fi crescut și se poate ajunge la deranjamente funcționale esențiale. Revenim pentru argumentare în acest sens cu prelungirea tripletului de bază repeat, care conduce la sindromul X-fragil, respectiv boala dramatică **Chorea Huntington**:

4.3.1.2. Familii multigene

Proteinele sau ARN-ul sunt codificate de către gene atât la pro cât și la eucariote, gene disponibile în genom într-o singură copie.

Prin **familii multigene** trebuie să înțelegem totuși o colecție de gene **identice** sau **aproape identice**. Ele sunt copii ale aceleiași gene și reprezintă excepția de la normalul prezentat în prima frază. Ele denotă în același timp o mare unitate secvențială.

Scanned with OKEN Scanner

Deşi nu este demonstrat ştiinţific, este foarte probabil ca membrii unei atare familii să fi apărut şi dezvoltat dintr-o singură genă precursoare.

Membrii unei familii multigene pot să apară sub formă asociată, de grămadă sau să fie presărate în genom. Unele familii adună laolaltă gene care obişnuit se aşază dens una lângă alta.

Acestea sunt:

- multigene ale aceleiaşi familii care codează pentru proteine histonice despre care s-a vorbit mai sus;
- familii multigene identice care codează frecvent produse ARN.

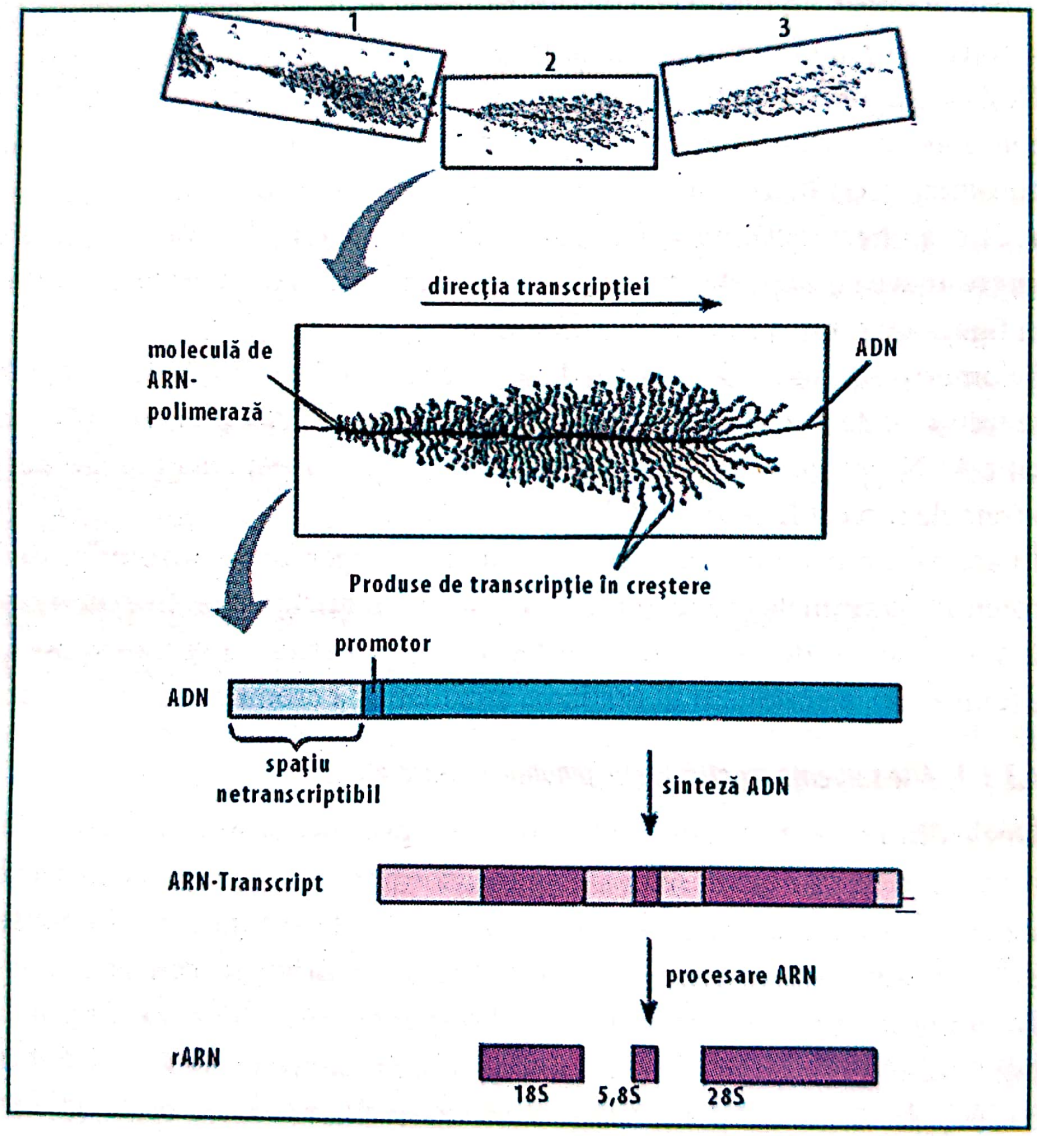


Fig. 135 – O parte a familiei de gene identice şi producerea ARN-ului
La microscopul electronic s-au identificat trei din sutele de copii de gene identice care codează procesarea rARN-ului (1, 2, 3). Ele au fost extrase din genomul salamandrei. Fiecare „pană" corespunde unui segment ADN cu transcript ARN alcătuit din circa 100 molecule de polimerază ARN (punctele negre pe ADN, poziţia a 2-a în schemă) care se mişcă de la stânga la dreapta. Transcriptele ARN în creştere se aseamănă cu nişte excrescenţe ale ADN. Genele sunt ordonate în tandem deşi fiecare este separată de cealaltă printr-un spaţiu de secvenţe ADN netranscriptibil. Produsele ARN rezultate prin transcripţie vor fi procesate şi se vor obţine 3 tipuri de molecule ARN: 18s, 5,8s şi 28s (litera „s" provine de la coeficientul de sedimentare obţinut analitic prin ultracentrifugare şi reprezintă o măsură pentru masa moleculară) (*Campbell A.N.*)

Scanned with OKEN Scanner

Un exemplu în acest sens este o familie de gene identice care codează, codifică 3 produse ribozomale: ARN (rARN...) (fig. 135). Aceste gene se află în tandem de sute sau mii de copii identice, în serie, una lângă alta, aşezate în genomul eucariotelor policelulare.

Ele formează, pe de altă parte, uriaşe şiruri de gene care dau posibilitatea celulelor de a sintetiza milioane de ribozomi necesari pentru o intensivă sinteză a proteinelor.

Am afirmat mai sus că există familii multigene formate din gene **neidentice** (nu putem spune „diferite" pentru că, coeficientul de asemănare este destul de mare). Un exemplu foarte studiat şi deci foarte cunoscut este cel alcătuit din grupe învecinate care alcătuiesc o familie ca mai sus şi anume familia genelor globulin (globulinice) care codifică α şi β - lanţuri de polipeptide hemoglobinice (fig. 136).

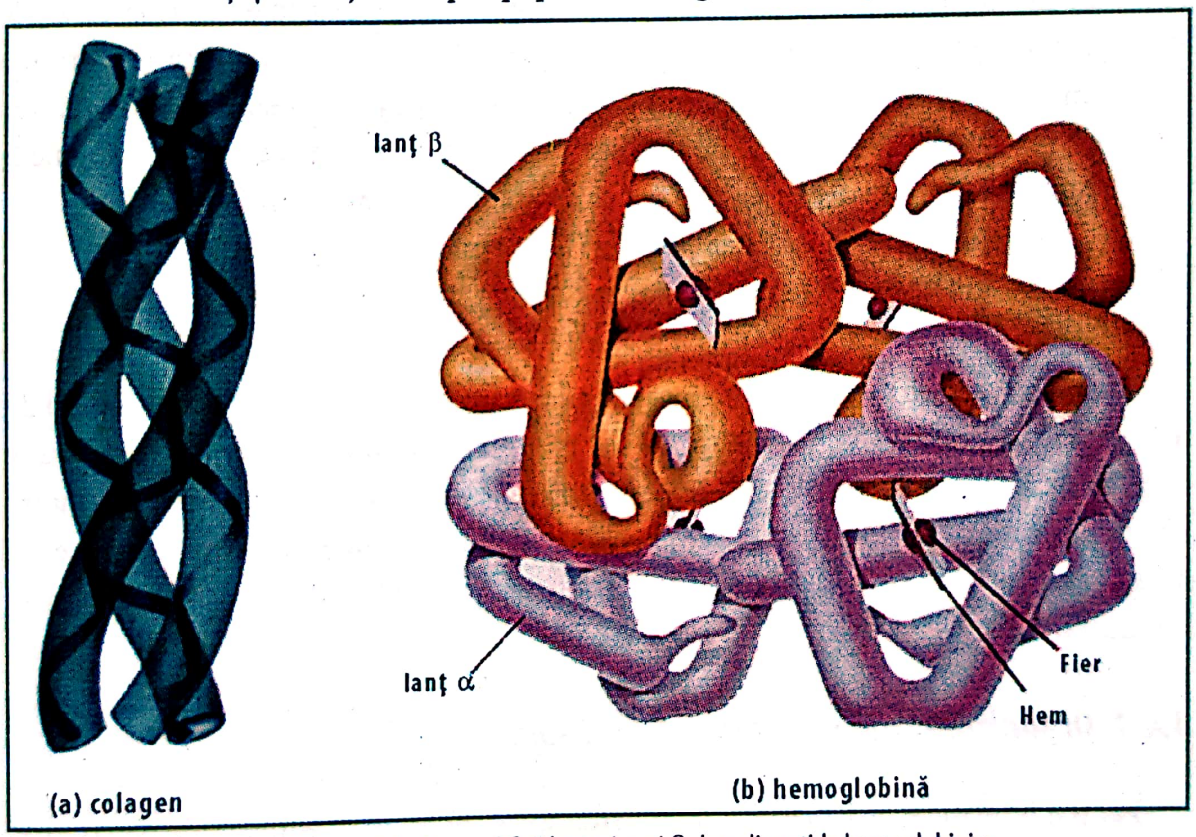


Fig. 136 – Familiile multigene neidentice codifică lanţuri α şi β de polipeptide hemoglobinice
a) Colagen, o fibră proteică formată din polipeptide helicoidice foarte puternice şi superspiralate care ocupă 40% din proteinele corpului uman şi care se găsesc ca material de legătură în toate organele.
b) Hemoglobina este o proteină globulară formată din 4 subunităţi, 2 lanţuri α şi 2 lanţuri β. Fiecare subunitate poartă şi o componentă nepolipeptidică (Hem) cu un atom de fier care leagă oxigenul (*Campbell A.N.*)

O familie de gene care la specia umană se află pe cromozomul 16 codează diferite variante ale α-globinelor. Alte gene localizate pe cromozomul 11 codifică versiunea β-globinelor. Schema de manifestare a acestor familii de gene este prezentată în capitolul 18 al „Biologiei" lui Neil A. Campbell (ed. 2000) şi nu vom insista asupra ei pentru că este mai puţin importantă pentru subiectul acestei cărţi. ■

Scanned with OKEN Scanner

4.4. CONTROLUL MANIFESTĂRII GENELOR PE DRUMUL DINTRE GENĂ ŞI PROTEINA FUNCŢIONALĂ

Am arătat deja că simpla organizare a cromatinei îndeplineşte cel puţin 2 scopuri, 2 funcţii importante.

1) Oferă posibilitatea ADN-ului de a se aglomera, plia şi ambala într-o formă extrem de compactă în nucleul celular.
2) În acelaşi timp, este clar că un asemenea „ambalaj" nu poate fi arbitrar. Forma fizică a ADN-ului dimprejurul genei este importantă pentru controlul regiunii (zonei) în care acesta „eliberează" transcripţia. S-a demonstrat deja că heterocromatinele extrem de condensate nu se exprimă. Poziţia relativă a unei gene în raport cu locul de contact al benzii cromatinice cu lumina nucleară şi nucleosomii determină sau nu exprimarea acesteia. Cu alte cuvinte, disponibilitatea genei de a se manifesta nu este decisă de ea singură. Celulele sunt acelea care permit eliberarea manifestării genelor lor în funcţie de:
   - condiţiile în continuă modificare ale mediului;
   - semnalele pe care le primeşte din exterior;
   - diferite stadii de diferenţiere.

Toate aceste trei grupe de factori sunt implicaţi în decizia celulelor şi sunt factori de regularizare a expresiei genelor. Prin aceste condiţii şi semnale externe putem spune că genele implicate în transcripţie sunt puternic controlate şi regularizate. În figura 137 este prezentată o schemă a „paşilor" care descriu expresia genelor la eucariote, cu care ocazie sunt scoase în evidenţă acele studii, etape în care expresia unei gene poate fi regularizată. ■

4.4.1. Organizarea genelor tipice la eucariote

Pentru a înţelege organizarea unei gene tipice, precum şi zonele sale de control, vom apela la desenul din figura 138. Dacă ne amintim capitolele anterioare, constatăm că diferenţa esenţială între o genă procariotă şi una eucariotă în prezenţa intronilor la acestea din urmă, adică acele secvenţe neutre, care nu codează, aşezate alternativ şi întâmplător cu segmente care codează, adică sunt active în fenomenele genetice de bază ale celulei.

Un alt element de diferenţiere a genei eucariotice prezent în figura 138 îl constituie prezenţa şi a altor secvenţe de control care nu codează. Ele sunt localizate o parte în apropierea promotorului, iar o altă parte de ordinul miilor de baze sunt situate la distanţă mai mare de acesta. Aceste secvenţe sunt denumite **Enhancer** şi au o mare influenţă asupra transcripţiei iniţiată de gena în care se află. Asupra acestui mecanism de control vom reveni. ■

Scanned with OKEN Scanner

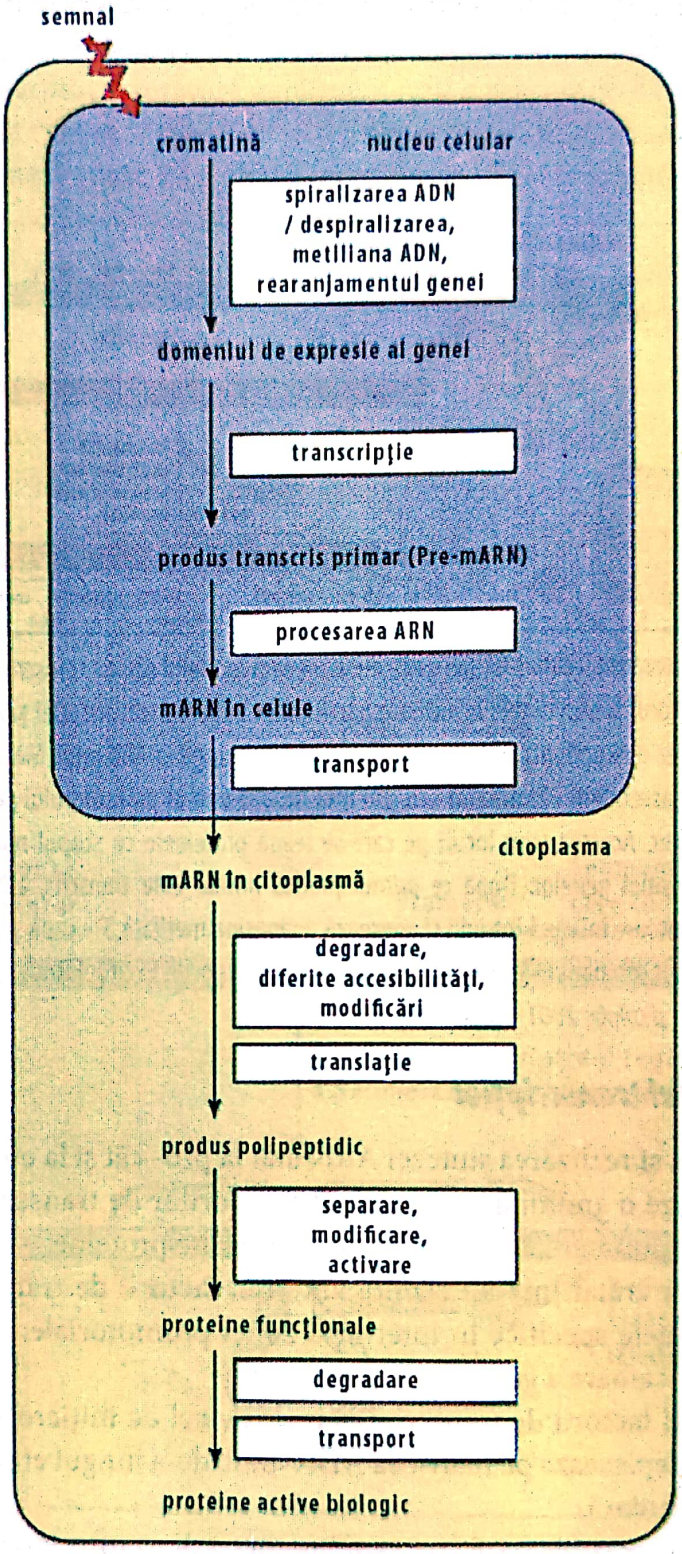


Fig. 137 – Schemă a posibilităţilor de control a exprimării genelor celulelor eucariotelor. Spre deosebire de procariote, celulele eucariotelor sunt prevăzute cu o membrană a nucleului care separă transcripţia de translaţie atât în spaţiu cât şi în timp. Acest comportament oferă mai multe posibilităţi controlului posttranscripţional al procesării ARN-ului. În plus, la eucariote există o mai mare diversitate a mecanismelor de control la nivelul genelor (pretranscripţional) şi la nivelul proteinelor (posttranscripţional). În desen toate procesele care sunt implicate în regularizarea exprimării genei sunt prezentate în alb (căsuţe albe) *(prelucrare după Campbell A.N. şi colab., 2003)*

Scanned with OKEN Scanner

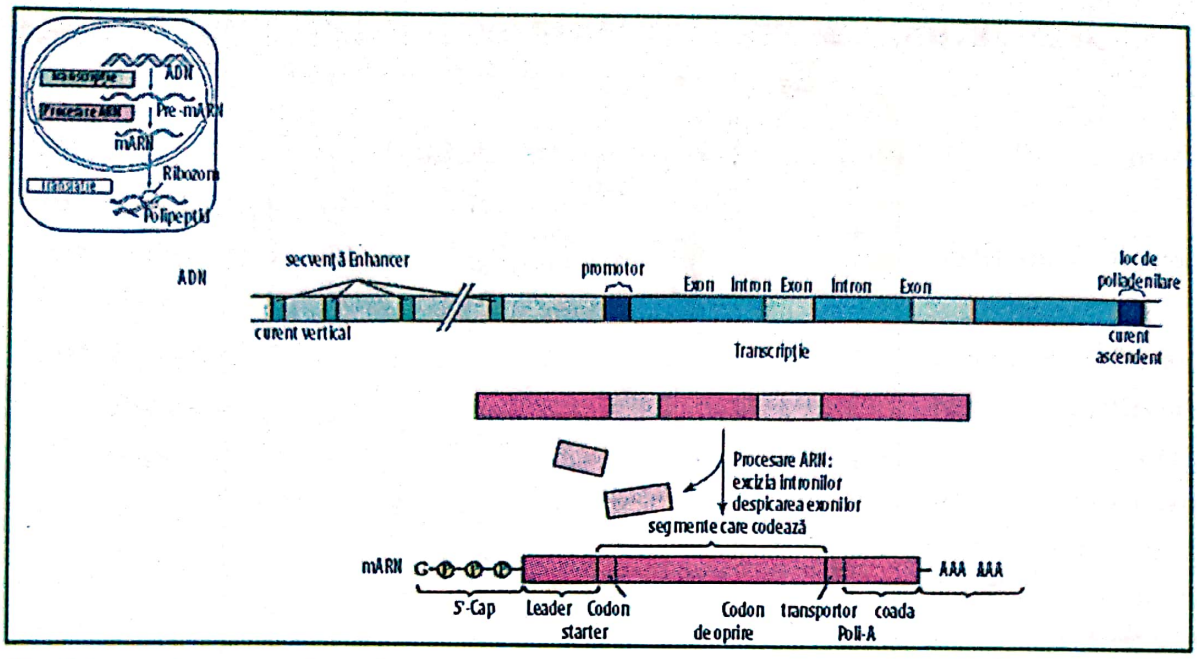


Fig. 138 – Arhitectura moleculară a unei gene eucariotice şi modelul său de transcriere. Promotorul şi secvenţele învecinate participă la iniţierea transcripţiei şi în felul acesta curentul/mişcarea descendentă (downstream) conduce la alungirea ARN-ului. Mai multe mii de nucleotide curent ascendent (upstream) sau curentul descendent al promotorului poziţionează secvenţele - Enhancer. Acestea sunt locuri pe care se leagă proteinele cu scopul regularizării, a controlului transcripţiei genelor. După ce primul produs primar este transcris, adică sintetizat, enzimele procesatoare înlătură intronii şi anexează guanosina metilată 5' - capă şi coada Poli (A) 3'-final. Din acest moment mARN-ul este gata pentru a fi exportat în citoplasmă
(Lodish şi colab., 2001 – prelucrare)

4.4.2. Controlul transcripţiei

Declanşarea şi realizarea sintezei ARN atât la pro- cât şi la eucariote începe numai după ce se atinge o anumită concentraţie a factorilor de transcripţie format de complexul enzimă (polimerază ARN) şi numeroase alte proteine.

Aşa cum s-a arătat într-un capitol anterior, factorii de transcripţie enumeraţi se leagă de secvenţele specifice în interiorul zonei promotoriale, dar neapărat înaintea secvenţei codificatoare a genei implicate.

După ce toţi factorii de transcripţie, inclusiv cei de iniţiere au fost legaţi, cuplaţi, polimeraza se deplasează pe matricea ADN-ului, de-a lungul ei şi sintetizează o bandă ARN complementară.

La eucariote se cuplează factori suplimentari de transcripţie selectivi pe alte elemente regulatorii cărora le aparţin şi zonele Enhancer ale ADN-ului, alcătuite din mii de nucleotide, depărtat aşezate de promotor şi de secvenţele de codare. O altă lume genetică, am spune noi. Şi totuşi, asocierea dintre factorii de transcripţie şi Enhancer în genom joacă un rol important în controlul exprimării genelor la eucariote.

Se pune, firesc, întrebarea, cum este posibil ca secvenţe de ADN atât de îndepărtate să poată influenţa transcripţia promotorilor specifici.

Scanned with OKEN Scanner

Ca regulă se consideră că zona Enhancer contribuie la mărirea ratei de transcripţie care realizează apoi un contact cu alţi factori de transcripţie şi cu polimeraza ARN. Se realizează în felul acesta o legătură suplimentară cu promotorul (fig. 139). Diferiţi factori de transcripţie care se leagă la diferiţi Enhancer pot în mod selectiv să activeze în anumite stadii de dezvoltare a celulelor exprimarea genelor specifice.

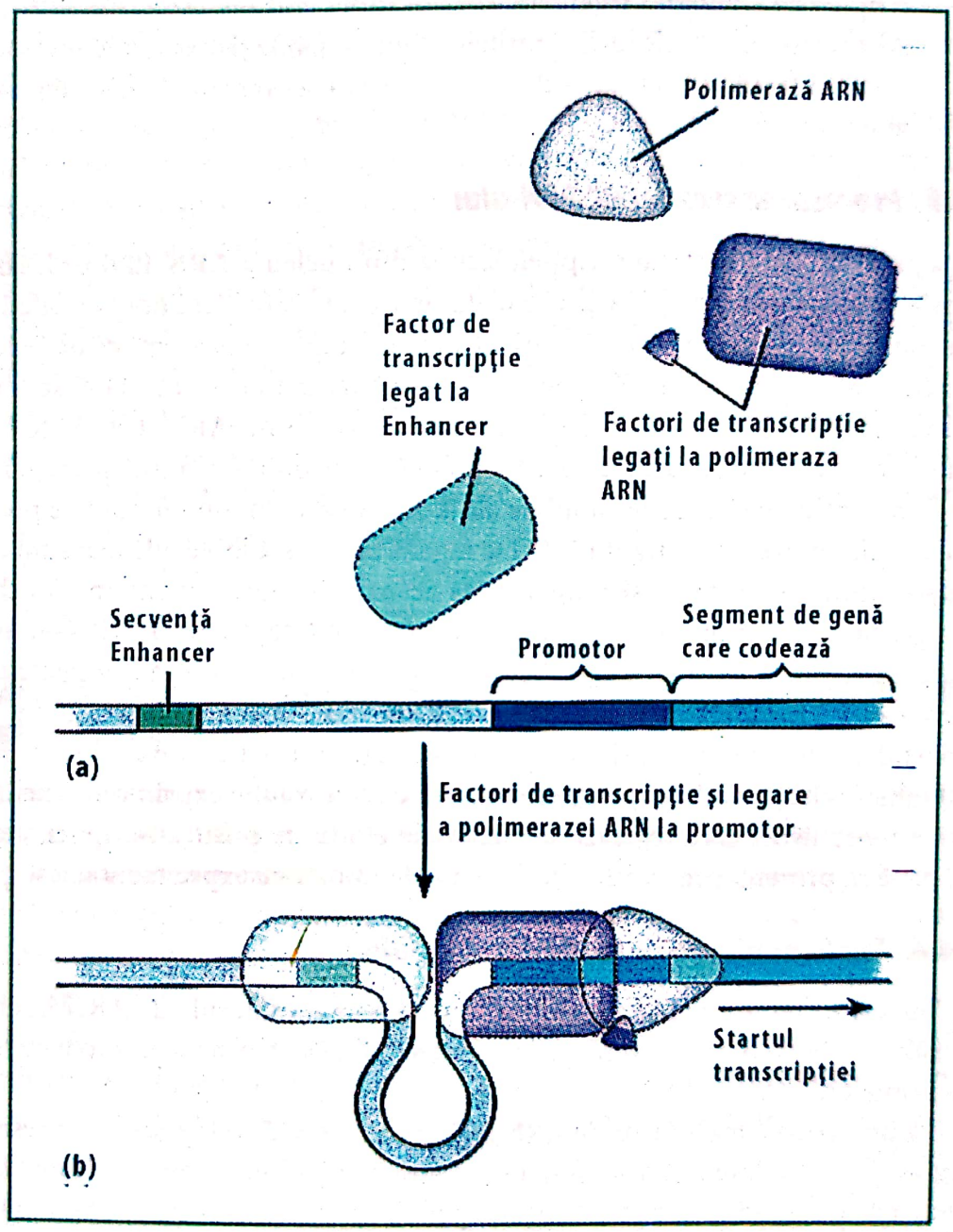


Fig. 139 – Rolul Enhancer-ului ca funcţie de control în exprimarea genelor la eucariote. Polimeraza ARN necesită proteine suplimentare care sunt denumite factori de transcripţie destinaţi pentru a recunoaşte regiunile promotoare ale genelor circuitului ascendent şi a se cupla de acestea. Zonele Enhancer se află adesea la o distanţă considerabilă de genă (a). Cuplarea unui factor de transcripţie la un Enhancer stimulează formarea complexelor necesare alcătuite din polimerază-ARN şi alţi factori de transcripţie (b) *(prelucrare după Campbell A.N., 2000)*

Scanned with OKEN Scanner

Pe mai departe s-a constatat că, controlul transcripţiei mai depinde de proteinele regulatorii care se leagă de ADN ca şi de alte proteine. Sute de factori de transcripţie au fost descoperiţi la eucariote, inclusiv aceia care se leagă la Enhancer. Deşi apar ca foarte diferenţiate, aceste proteine posedă totuşi câteva elemente structurale comune.

- Fiecare proteină deţine un **domeniu** de prindere la ADN - sunt deja cunoscute 3 tipuri de asemenea legături.
- Alte regiuni ale moleculelor proteice sunt variabile şi domeniile acestora permit fiecărui factor de transcripţie să recunoască secvenţele ADN interesante ca şi alte proteine. ■

4.4.3. Procesarea şi exportul ARN-ului

Separarea spaţială a transcripţiei, ieşirea din nucleu a ARN-ului procesat şi apoi translaţia este o însuşire de bază a celulelor eucariote care oferă noi posibilităţi pentru controlul exprimării genelor. S-a arătat deja că după transcriere, celula eucariotă îi acordă acestuia un anumit timp pentru a se matura înainte ca acesta să se transforme în una din formele lui de manifestare: mARN, tARN sau rARN. Un mARN transcris conţine o structură - cap şi o coadă - poli (A). Intronii vor fi îndepărtaţi, iar exonii vor fi în continuare despicaţi unul de altul. Acesta este în fond modul de procesare al mARN-ului prezentat în figura 139. De regulă, la această moleculă mai sunt adăugate, agăţate, anumite proteine şi numai după aceea prin porii membranei nucleare este transportat în exterior, în citoplasmă mARN-ul. În citoplasmă, mARN-ul interacţionează cu o serie de proteine specifice şi apoi se asociază ribozomilor pentru a realiza translaţia. În fiecare pas al procesării mARN-ului, în toate mecanismele legate de exportul acestuia din nucleul celulei, precum şi în translaţia care are loc în citoplasmă se întâlnesc alte posibilităţi pentru manifestarea controlului exprimării genelor. Despre aceste mecanisme care reglează următoarele etape ale posttranscripţiei, cercetătorii au, până în prezent, prea puţine cunoştinţe demonstrate experimental. ■

4.4.4. Reglementarea degradării mARN-ului

Întârzirea temporară sau mai îndelungată a unei molecule de ARN în citoplasmă constituie, de asemenea, un factor de control al derulării sintezei proteice în celulele eucariotelor.

La procariote, moleculele de ARN au în mod normal o viaţă scurtă. Adesea ele sunt degradate numai după câteva minute de către enzime specifice. Acesta este şi motivul pentru care bacteriile îşi pot modifica repede modelul de sinteză proteică în funcţie de modificările mediului. La eucariote, moleculele mARN dispun de mult timp, ore, zile şi chiar săptămâni. Un exemplu impresionant privind durata vieţii mARN se află în celulele roşii ale sângelui mamiferelor, care constituie uzina de fabricare a hemoglobinei. mARN-urile destinate hemoglobinei sunt neobişnuit de stabile şi se lasă de mai multe ori translatate în celulele roşii ale sângelui. Două sortimente de mARN se pot diferenţia în ceea ce priveşte viteza lor de degradare în funcţie de enzimele care le degradează. Diferenţierea este dată de frecvenţa cu care fiecare moleculă ARN este translatată.

Scanned with OKEN Scanner

În situațiile în care totuși trebuie depozitate cantități mari de mARN, cum este de exemplu cazul celulelor de reproducere nu este suficientă numai blocarea translației, ci și degradarea enzimatică. În unele cazuri proteinele ancorate la mARN împiedică atât translația cât și degradarea enzimatică a ARN. La alte produse transcrise modificările privind lungimea cozii poli (A) influențează viteza degradării acestora.

Mecanisme specifice, dar mai puțin importante pentru scopul acestei cărți, influențează controlul translației și al posttranslației despre care s-a vorbit în detaliu într-un capitol anterior.

Important este de reținut că genele controlate sunt extrem de atent monitorizate și că ele nu întreprind nimic din funcțiile care vor să le exprime până nu primesc de la secvențele de ADN specializate semnalele necesare. Pentru aceasta genele codante trebuie așezate în cromozom într-o anumită ordine.

O altă situație prin care controlul genelor conduce la exprimarea diferențiată a genelor o constituie celulele embrionare. În procesul de dezvoltare al embrionilor, celulele trebuie să se diferențieze în țesuturi și organe. Exprimarea genelor în acest caz se face numai după recepționarea unor semnale chimice, semnale care vor influența numai anumite celule sau grupe de celule. Funcțiile acestor semnale constau în activarea factorilor de transcripție, ceea ce conduce din nou la exprimarea altor proteine regulatorii (adică alți factori de transcripție). Această cascadă de proteine regulatorii acționează ca reacție la semnalele care coordonează dezvoltarea și care sunt transmise grupelor de gene specifice dezvoltării țesuturilor. ■

4.4.5. Rolul hormonilor și al altor substanțe chimice în influențarea controlului exercitat de gene

O întrebare esențială în lumea științifică a biologiei moleculare este: cum poate mediul intern sau extern al unei celule să influențeze exprimarea genelor? Răspunsul e și el complicat și până în prezent nu există date științifice complete pentru a-i satisface pe toți curioșii acestei științe. Am văzut deja în capitolul anterior în ce măsură anumite metabolite organice, așa cum ar fi triptofanul în conjuncție cu anumite proteine regulatorii care alcătuiesc represorul operonului Trp influențează controlul transcripției. Conformațiunea acestor proteine regulatorii este schimbată, ceea ce influențează capacitatea de a se cupla la ADN. Și la eucariote acționează molecule organice mici asupra transcripției în măsura însă în care acestea se cuplează la proteinele regulatorii. Și cum afirmam în titlu că mediul extern celulei poate influența asupra exprimării genelor, este cazul acum să precizăm că printre aceste substanțe care într-adevăr pot modifica exprimarea genelor se numără hormonii steroizi ai animalelor. Aceștia sunt transportați cu ajutorul sângelui și servesc ca transportor al aceluiași semnal, între diferite celule, celule care se pot afla la distanțe mari una de alta în diferite părți ale corpului organismului. Hormoni de tip steroizi se găsesc și la insecte și vom începe acest model de control al exprimării genelor mai întâi la insecte. Trebuie precizat aici că nu numai hormonii steroizi transmit asemenea semnale celulelor și genelor aflate la distanță una de alta dar și alte molecule chimice.

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

REȚINEȚI! Asemenea modele de reglementare a exprimării genelor pot fi foarte utile în biotehnologiile genetice. O dovadă a acțiunii gen regulatorie a hormonilor steroizi la insecte o constituie așa-numitele umflături ale cromozomilor (puffs-cromozomi).

Există la insecte și nu numai la ele așa-numiții cromozomi-giganți cunoscuți și ca **politen-cromozomi**. Cercetările efectuate pe asemenea cromozomi, prezenți în glandele salivare și în alte țesuturi ale larvelor anumitor insecte au condus la a demonstra rolul steroizilor asupra controlului exprimării genelor la nivelul transcripției. Politen-cromozomii sunt alcătuiți din sute de cromatide paralele care rezultă din numeroase runde de replicări ale ADN-ului fără ca celula să se dividă. În anumite stadii de dezvoltare a larvelor apar aceste „umflături" (ca niște ganglioni cromozomici) în anumite locuri pe cromozomul gigant (fig. 140).

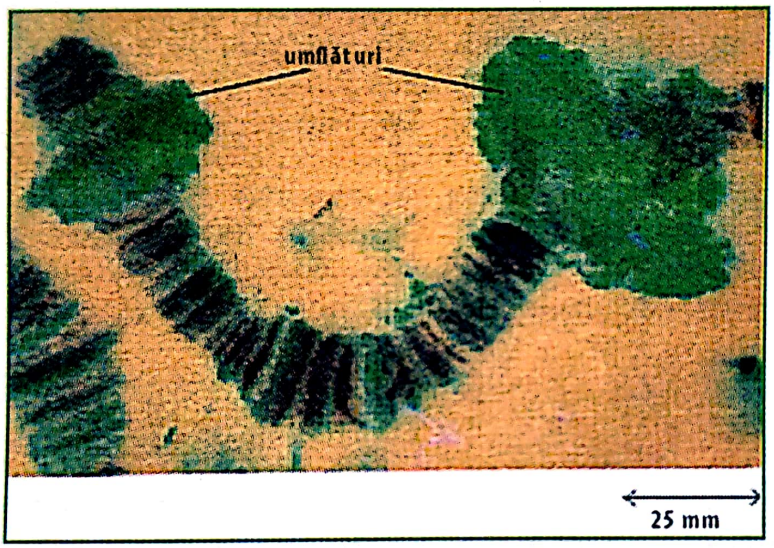


Fig. 140 – Umflături pe cromozomi la insecte.
Aceste umflături în engleză se citesc [paff]. Fotografia este făcută la microscopul electronic pe un cromozom gigant (politen) al unui țânțar (*Trichosia pubescens*) - familia *Sciaride*. Poziția celor 2 umflături se schimbă în decursul evoluției larvei. Umflăturile sunt efecte vizibile ale activității genelor - locurile unei transcripții active. Adăugirea unui hormon al îndepărtării pielii (năpârlirii) denumit Ecdison asupra cromozomilor izolați a condus la obținerea unor mostre de umflături similare cu cele naturale observate în perioada năpârlirii larvelor *(după Campbell A.N., 2000)*

O asemenea umflătură (puff) apare numai dacă se răsucește, se întoarce banda ADN-ului cromozomal în jurul axei sale. Prin crearea unei asemenea benzi răsucite ADN-ul devine ușor disponibil mașinăriei transcripționale. Cercetări efectuate prin metoda autografierii au arătat că prezența umflăturilor în zonele active imprimă o puternică activitate de transcriere.

Dacă larvele năpârlesc, o parte a umflăturilor dispar, dar pot apărea altele noi. Apariția și dispariția umflăturilor constituie un indiciu al unei cuplări și decuplări selective a genelor specifice în timpul dezvoltării lor.

Modificările mostrelor de umflături pot fi induse de către Edicson, adică de acel hormon steroidic care acționează asupra năpârlirii larvelor. Rezultă că genele regulatorii ale năpârlirii la insecte reacționează la semnale chimice și în mod deosebit la steroizi. ■

4.4.6. Hormonii steroizi la vertebrate

De la început trebuie să precizăm că cercetările în acest domeniu sunt departe de a fi clarificat problemele legate de această temă, dar că cercetătorii se preocupă intensiv cu studiul rolului hormonilor sexuali asupra influențării exprimării genelor în celulele vertebratelor.

Steroizii sunt molecule solubile în lipide. Dacă o celulă este tratată cu un steroid, atunci hormonul difuzează, penetrează prin membrana plasmatică în citoplasmă unde se împrăștie.

În citoplasmă el întâlnește un receptor proteic cu capacitatea de a solubiliza hormonul, sau în alte situații hormonul se cuplează de receptor. În ambele cazuri se formează un **complex hormon-receptor** care apoi penetrează în nucleu.

În absența steroidului, proteina receptor este în mod obișnuit cuplată la o proteină inhibitorie care împiedică în acest caz cuplarea receptorului la ADN (fig. 141a).

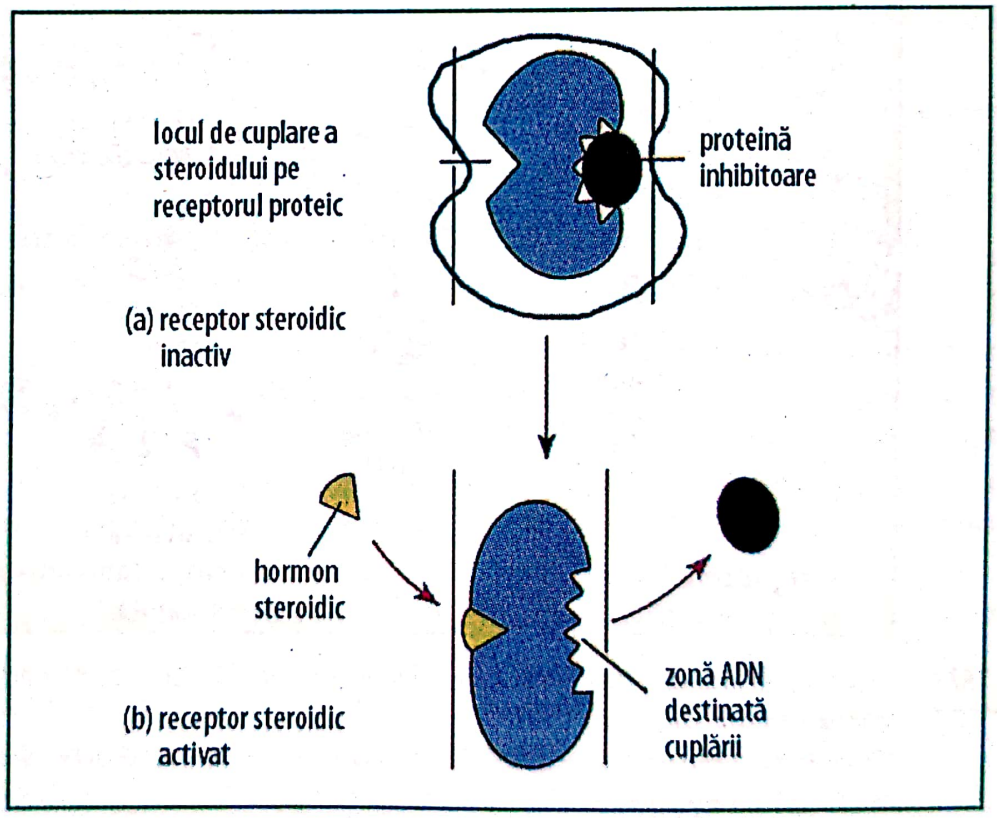


Fig. 141 – Modul de activare a unui complex receptor – steroid.
a) Receptorul steroidic este o proteină ADN cu capacități de a cupla hormonul, care apoi stimulează genele specifice transcripției. În absența steroizilor o proteină împiedică cuplarea receptorului la ADN.
b) Steroidul dispune (dă dispoziție) receptorului proteic prin modificarea structurii sale să elibereze inhibitorul și prin aceasta el se poate cupla la secvența regulatorie a ADN-ului. Prin acest mecanism hormonii steroidici activează exprimarea anumitor gene în moleculele țintă dorite.

Scanned with OKEN Scanner

Cuplarea hormonului steroidic la receptor conduce la eliberarea inhibitorului iar receptorul proteic activat poate să se cupleze acum pe zona specifică a ADN-ului (fig. 141 b). Aceste locuri de cuplare se află în interiorul enhancer-ilor sau a altor elemente regulatorii care controlează, regularizează genele dependente de steroizi.

Cuplarea receptorului proteic la un enhancer activează transcripția și pe această cale steroidul acționează ca un semnal chimic care conduce la cuplarea anumitor gene specifice ale celulelor. Spuneam mai sus că există și alți hormoni de natură nesteroidică care pot acționa asupra transcripției.

Acești hormoni nesteroizi nu sunt solubili în lipide și deci nu pot traversa membrana plasmatică și ca urmare vor acționa printr-un receptor proteic plasat pe partea exterioară a celulei. Cuplarea unui astfel de hormon la receptorul său inițiază o cascadă de semnale traductibile care în final conduc la activarea anumitor factori de transcripție și induc apoi transcripția genelor specifice (fig. 142).

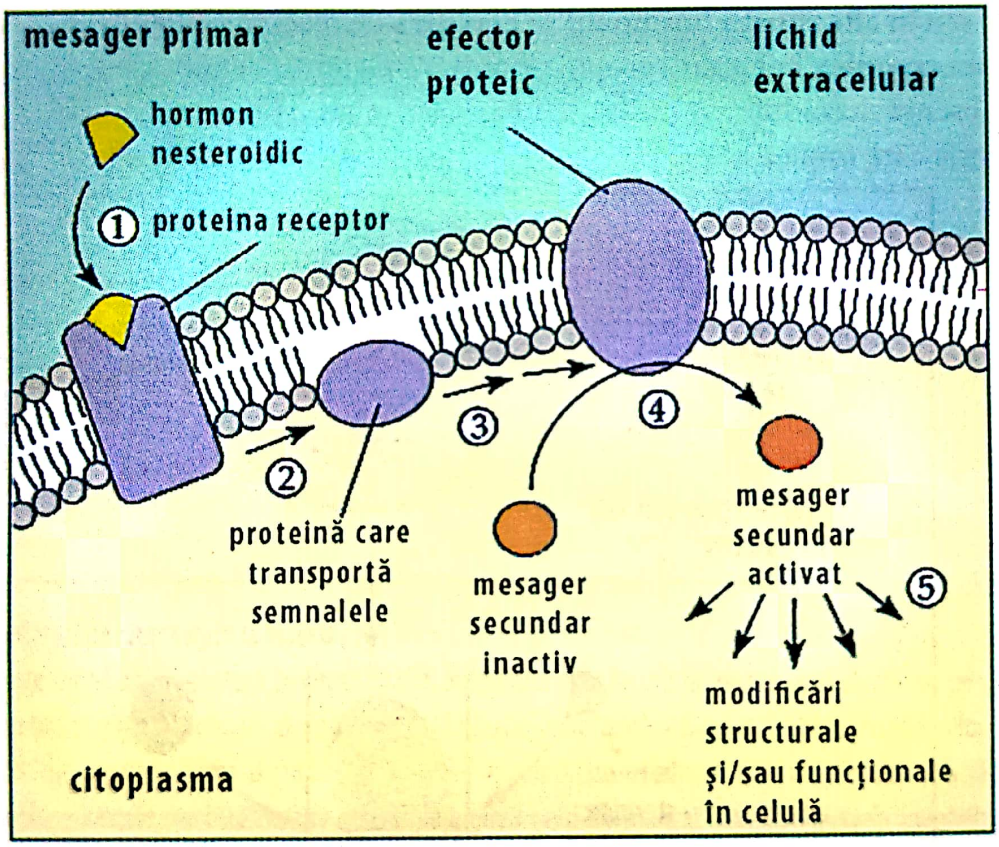


Fig. 142 – Controlul prin mesaje, semnale în afara membranei plasmatice (cazul hormonilor nesteroizi) - schema extrem de simplificată
(1) Mesagerul primar (hormon nesteroidic) este o moleculă care se află în lichidul extracelular, dar care se cuplează la proteina receptor.
(2) Receptorul activează membrana proteică.
(3) O proteină efector este și ea activată.
(4) Efectorul este o enzimă poziționată de o parte și de alta a membranei care activează la rândul ei un mesager secundar.
(5) Mesagerul secundar transmite semnalele pentru modificările funcționale sau structurale ale celulei. În cazul nostru activează factorii de transcripție și induce genelor specifice necesitatea transcripției

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie, principalele puncte ale controlului exprimării genelor la eucariote fără modificări ale celulelor sunt următoarele:

1) În diferitele tipuri de celule ale unui organism pluricelular se exprimă gene diferite - conform principiului specializării pentru funcții diferite.
2) Arhitectura cromatinei poate determina exprimarea genelor specifice transcripției. Modul de construcție al cromatinei poate face ca un număr mai mare sau mai mic de gene să fie accesibile transcripției, iar de fiecare dată „restul" să rămână blocate.
3) Pe zona transcripțională a genei se află la fiecare pas de manifestare a genei posibilități multiple de regularizare a acesteia de către proteine funcționale - pe două direcții:
   a) Controlul determină, hotărăşte, în primul rând, care gene trebuie să se exprime, să se manifeste.
   b) La eucariote, controlul şi controlorii (proteine funcționale) stimulează o cuplare selectivă a factorilor de transcripție la secvențele enhancer ale ADN-ului genelor specifice transcipției.
4) Activitatea regulatorie a unor asemenea complexe ADN-proteine funcționale sunt uneori puternic influențate de semnale chimice induse de anumiți hormoni sau alte substanțe chimice.

Subliniem că aceste mecanisme ale controlului genelor sunt studiate pe fondul nemodificării ADN-ului în celule, adică genomul rămâne integru. ■

4.4.7. Modificări ale exprimării genelor datorită unor modificări chimice şi ale reaşezării unor segmente de ADN în genom

Am acceptat deja ideea expusă în capitolele anterioare precum că genomul unei celule poate fi modificat fie datorită unor procese şi substanțe chimice denumite şi mutații, fie datorită unor noi „restructurări"ale materialului genetic cauzate de asemenea sau de procese similare, unele cu caracter intern, dar influențate de factori externi. În rest putem afirma că fără îndoială compoziția chimică a secvenței nucleotide a ADN-ului unui organism pe întreaga sa viață rămâne constantă.

Există, aşa cum spuneam, şi anumite excepții importante care determină genomul unei celule să fie considerat „plastic". Aceste excepții sunt deja două:

- modificarea chimică a ADN-ului;
- deplasarea unor segmente ADN în genom.

Amândouă au o influență remarcabilă asupra exprimării genelor.

4.4.7.1. Mărimea numărului de gene şi pierderea selectivă a acestora

Există posibilitatea demonstrată prin cercetări că, uneori, în anumite țesuturi numărul copiilor unor gene sau a unei familii de gene să crească temporar pe perioada unui anumit stadiu de dezvoltare. Un asemenea caz îl întâlnim la genele care exprimă activitatea ribozomală cu crearea ARN (rARN) la amfibie. În stadiul de celulă ou se sintetizează un milion sau poate mai multe copii suplimentare din nucleolii ARN-ului situați

Scanned with OKEN Scanner

pe gene. Nucleolii sunt anumite zone separate de cromozomi şi care au fost fabricaţi prin reaşezare în ribozomi. Replicarea selectivă a anumitor gene denumită „amplificare de gene" este un proces important care măreşte exprimarea genelor rARN.

Ca urmare, celulele sexuale (seminale) deja dezvoltate pot produce cantităţi enorme de ribozomi. La rândul lor aceşti ribozomi creează posibilitatea unei creşteri fantastice a sintezei proteice după fecundarea celulelor seminale. Copiile suplimentare ale genelor rARN vor fi hidrolizate din nou mai târziu în perioada dezvoltării embrionare timpurii.

În alte cazuri, mai ales la insecte, se întâmplă ca în anumite ţesuturi să fie pierdute selectiv anumite gene (nu se întâmplă acest lucru în celulele care formează gameţi). În realitate ar fi posibil ca un întreg cromozom sau segmente cromozomale să fie eliminate din anumite celule în timpul dezvoltării embrionare. Amplificarea genelor poate fi observată, de asemenea, şi în celulele canceroase care au fost tratate cu doze mari dintr-un anumit chimioterapic.

În timp ce asemenea chimicale pot distruge un mare număr de celule ale tumorii, s-a demonstrat că permanent unele celule devin rezistente. Aceste celule conţin zone ADN amplificate în care se localizează genele rezistente.

Acest lucru s-a demonstrat deja în laborator în care concentraţiile ridicate ale unui asemenea chimioterapic au condus la o rezistenţă crescută în populaţia de celule canceroase.

REŢINEŢI! Pentru biotehnologi este interesant să ştie că rezistenţa anumitor paraziţi împotriva unor mijloace specifice de combatere se realizează frecvent prin selecţia amplificării genelor, adică o selecţie a celulelor care capătă proprietatea de a amplifica gene.

În felul acesta se obţin suşe de *Plasmodium* (agent al malariei) rezistente la substanţa chimică de combatere. Dar tot pe această cale se obţin suşe care creează ţânţari anofeli rezistenţi la insecticide, boli ale plantelor rezistente la fungicide sau buruieni rezistente la erbicide. Asupra acestor aspecte vom reveni. ■

4.4.7.2. Modele de dezordine în genom

Deşi pare surprinzător, schimbări semnificative ale genomului sunt provocate de recombinări ale unor segmente mai mari de ADN. A nu se confunda acestea cu recombinările genetice din timpul meiozei, ci din contra, în acest caz avem de-a face cu o dezordine a ADN-ului în celulele somatice prin care se efectuează şi o schimbare a locului genelor pe cromozomii lor. Acest model de dezordine este denumit „recombinare somatică" sau „rearanjament al ADN-ului". Fenomenul în cauză, oricum s-ar numi el, acţionează puternic asupra exprimării genelor.

În prim-planul recombinării somatice apar transpozonii despre care am scris anterior şi care conform ultimelor cercetări sunt prezenţi în toate organismele eucariotelor. Reamintim că transpozonii sunt segmente de ADN care se pot deplasa dintr-o poziţie în alta a genomului. Conform celor demonstrate deja, dacă un transpozon prin integrarea secvenţei lui, întrerupe exprimarea, funcţia genei este paralizată. În cazul că transpozo-

Scanned with OKEN Scanner

nul se strecoară în zona genei care reglementează transcripția, prin influențarea transcripției poate să crească sau să reducă cantitatea de proteine sintetizate.

În unele cazuri transpozonul conține el însuși o genă care devine activă dacă este înglobată în spatele unui promotor activ.

Așa cum a demonstrat Barbara Mc Clintock, la porumb, modificarea culorii boabelor se datorează conținutului de elemente genetice mobile de tip transpozon; s-a demonstrat ulterior că acesta poate să influențeze modificarea culorii florilor la diferite plante (fig. 143).

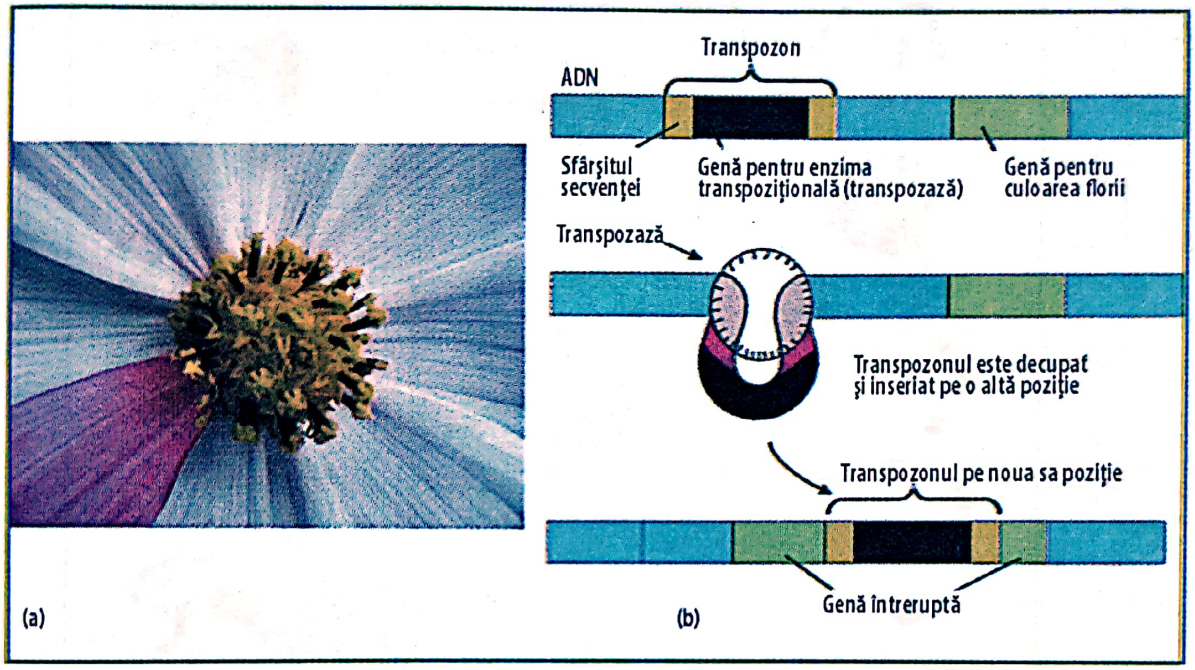


Fig. 143 – Transpozonul poate influența culoarea florilor.
a) Culorile diferite ale acestei flori sunt provocate de starea unui transpozon și aceasta pentru că el s-a deplasat de pe o poziție a genomului pe o alta care codifică o altă culoare. Prin aceasta a fost inactivată gena pentru exprimarea culorii. Celulele din regiunea mai intens colorată a florii exprimă alela pentru culoarea normală (roșie) a florii. Culoarea mai deschisă pe o zonă importantă a florii este dată de o clonă a celulelor a căror expresie genetică a fost modificată de către transpozon.
b) Schema simplificată de alături indică modul în care un transpozon poate întrerupe secvența codantă a unei gene (*fotografia a fost făcută de autor, la fel și desenul*)

4.4.7.3. Modelul imunoglobulinelor

La vertebrate există o grupă de gene provenită dintr-un model particular de dezordine, de haos (entropie genetică), creat de segmentele de ADN în timpul diferențierii celulare. Funcțiile acestui ADN reorganizat nu sunt foarte bine cunoscute. Aceste modificări au loc în acele gene care codifică (codează) anticorpii (imunoglobine). Anticorpii sunt acele proteine care reunesc în mod specific anumiți invadatori periculoși ai corpului nostru, precum virusurile, bacteriile ș.a., îi imobilizează prin cuplare și apoi îi distrug.

Scanned with OKEN Scanner

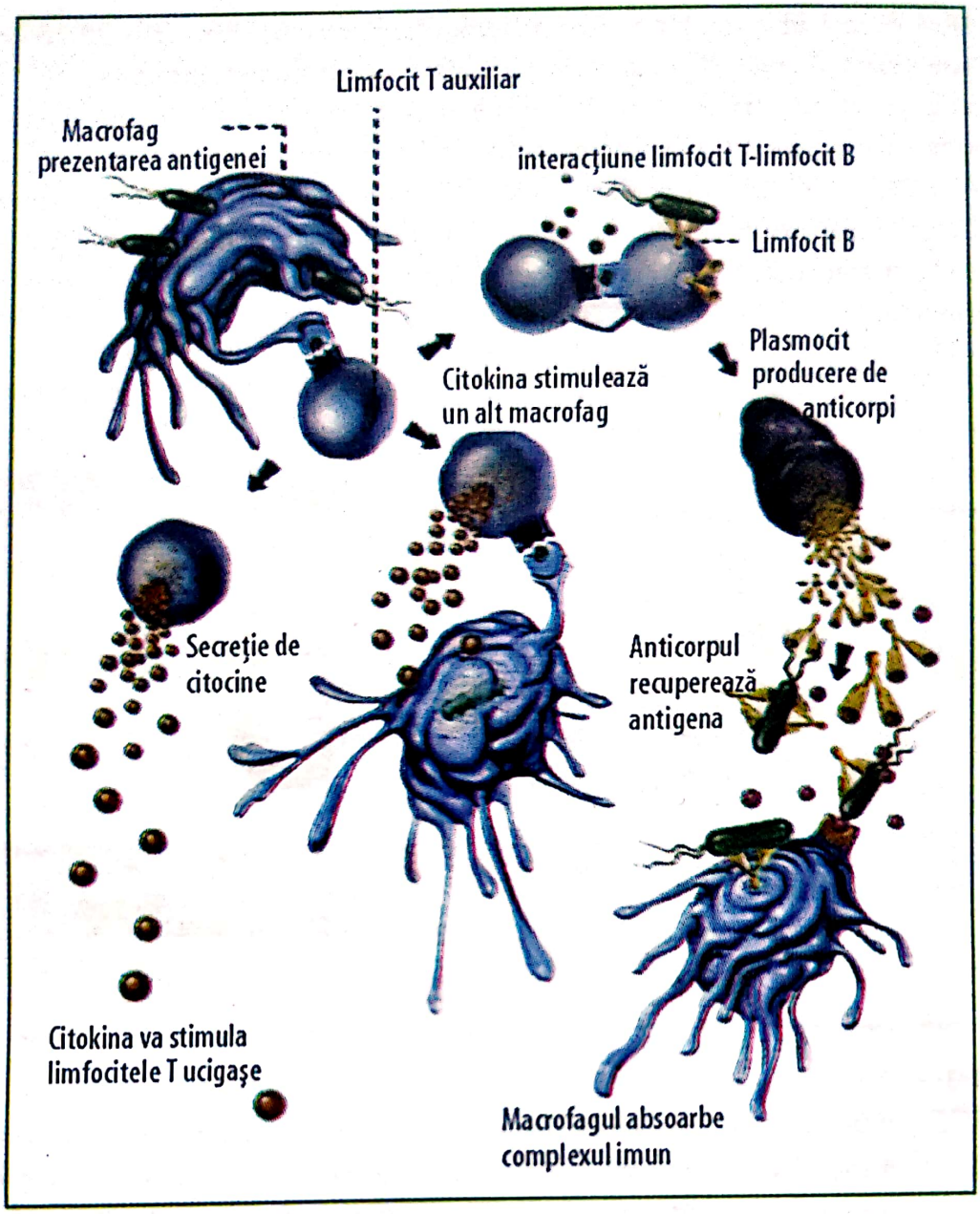
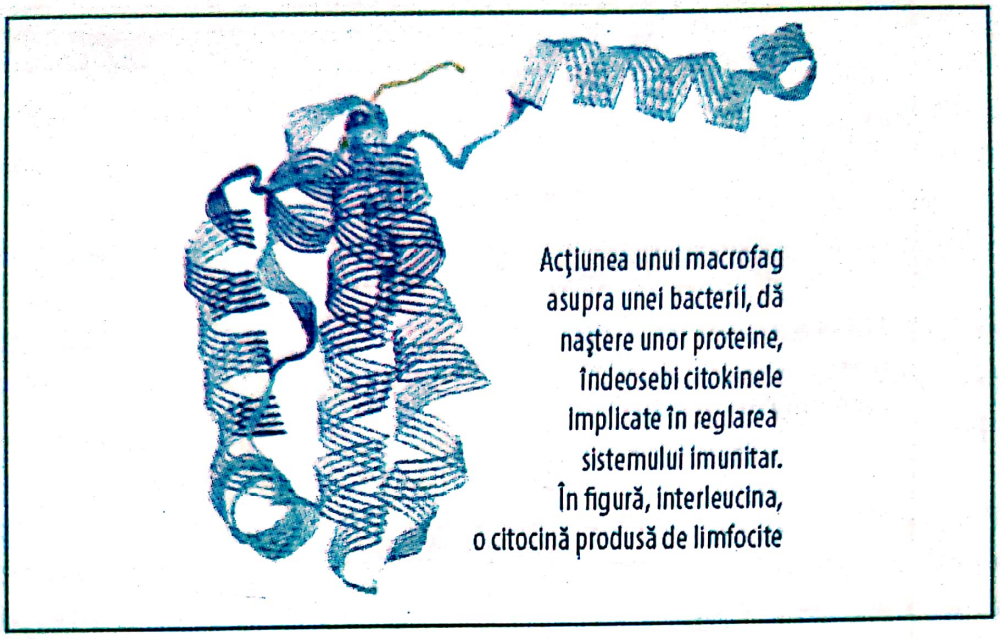


Fig. 144 a – Model de sistem imunologic.
La intrarea unei antigene în organism se declanşează prima linie de apărare (răspuns nespecific) Macrofagii (produşi în măduvă şi lansaţi în sânge) se concentrează în jurul focarului de infecţie şi produc citokine ce sunt eliberate în mediul celular. Aceste proteine atrag şi activează alţi macrofagi care încearcă să blocheze în lanţ infecţia. Substanţele de anihilare care se produc de către macrofagi poti fi radicali liberi sau alţi derivaţi oxigenaţi, dar şi enzime. Invazia celulelor fagocitare provoacă modificări în ţesuturi *(Science et Vie, supliment 226, martie 2004)*

Imunoglobinele sunt fabricate de celulele imunosistemului şi sunt cunoscute sub denumirea de B-limfocite sau B-celule.

În fond ele sunt un fel, un sortiment de celule albe ale sângelui. B-limfocitele (sau limfocitele B) sunt celule cu un grad foarte înalt de specializare la care fiecare celulă desprinsă şi diferenţiată, ca şi descendenţii ei mitotici (adică clonele lor) sintetizează un anumit tip de anticorp, cu scopul de a putea apăra de un intrus de asemenea specific (un tip de virus) cunoscut sub denumirea de antigenă.

Scanned with OKEN Scanner



Acţiunea unui macrofag asupra unei bacterii, dă naştere unor proteine, îndeosebi citokinele implicate în reglarea sistemului imunitar. În figură, interleucina, o citocină produsă de limfocite

Fig. 144b – Acţiunea citochinelor (detalii)

– A doua linie de apărare contra agresorului (răspuns specific) este alcătuită din limfocite care sunt selective faţă de macrofagi şi atacă doar microbii utilizându-se de informaţia genetică preluată de la macrofagi care au recunoscut deja agresorii.

– Există 2 feluri de limfocite: limfocitele T care recunosc agresorul după o cheie moleculară (receptori ai celulelor) şi limfocite B sau B-celule (anticorpii). Limfocitele B lansează, eliberează mii de anticorpi în sânge care devorează enzimatic agresorul.

– Limfocitele T devin şi ele active şi practice, un fel de luptă corp la corp cu agresorul, de aceea mai sunt denumite şi limfocite ucigaşe. După distrugerea agresorului, limfocitele mor şi ele până se atinge limita „memoriei imunitare" - un fel de gardieni permanenţi ai organismelor.

Întregul tablou al corpului uman constă în circa 10^{11} (1 + 11 zero-uri) molecule de anticorpi cu totul diferite. Înţelegem deci că este vorba de numărul de tipuri de anticorpi şi nicidecum de moleculele ale aceluiaşi tip.

Cercetătorii au fost multă vreme preocupaţi asupra întrebării: cum se poate ajunge la o atât de mare diversitate de anticorpi?

S-a demonstrat că mecanismul de formare a anticorpilor se plasează, de asemenea, pe un model de aglomerare a materialului genetic prezent în celula nediferenţiată, material format din segmente de ADN poziţionate apoi separat în genomul celulei embrionare (fig. 145). Pe această cale poate imunosistemul uman cu milioanele sale de subpopulaţii de limfocite B să fabrice alte milioane de diferite tipuri de anticorpi.

În figura 145 este prezentat, în partea de jos, prototipul unei molecule de imunoglobină din clasa IgG. Molecula anticorpului constă dintr-un lanţ de 4 polipeptide legate între ele printr-o punte bisulfidică. Fiecare lanţ este alcătuit din 2 segmente :

- o regiune, zonă constantă unde sunt aşezaţi toţi anticorpii aparţinând unei anumite clase;
- o regiune variabilă în care anticorpilor specifici li se conferă o unică funcţiune şi anume capacitatea acestora de a recunoaşte o antigenă specifică-străină pe care să o imobilizeze.

Scanned with OKEN Scanner

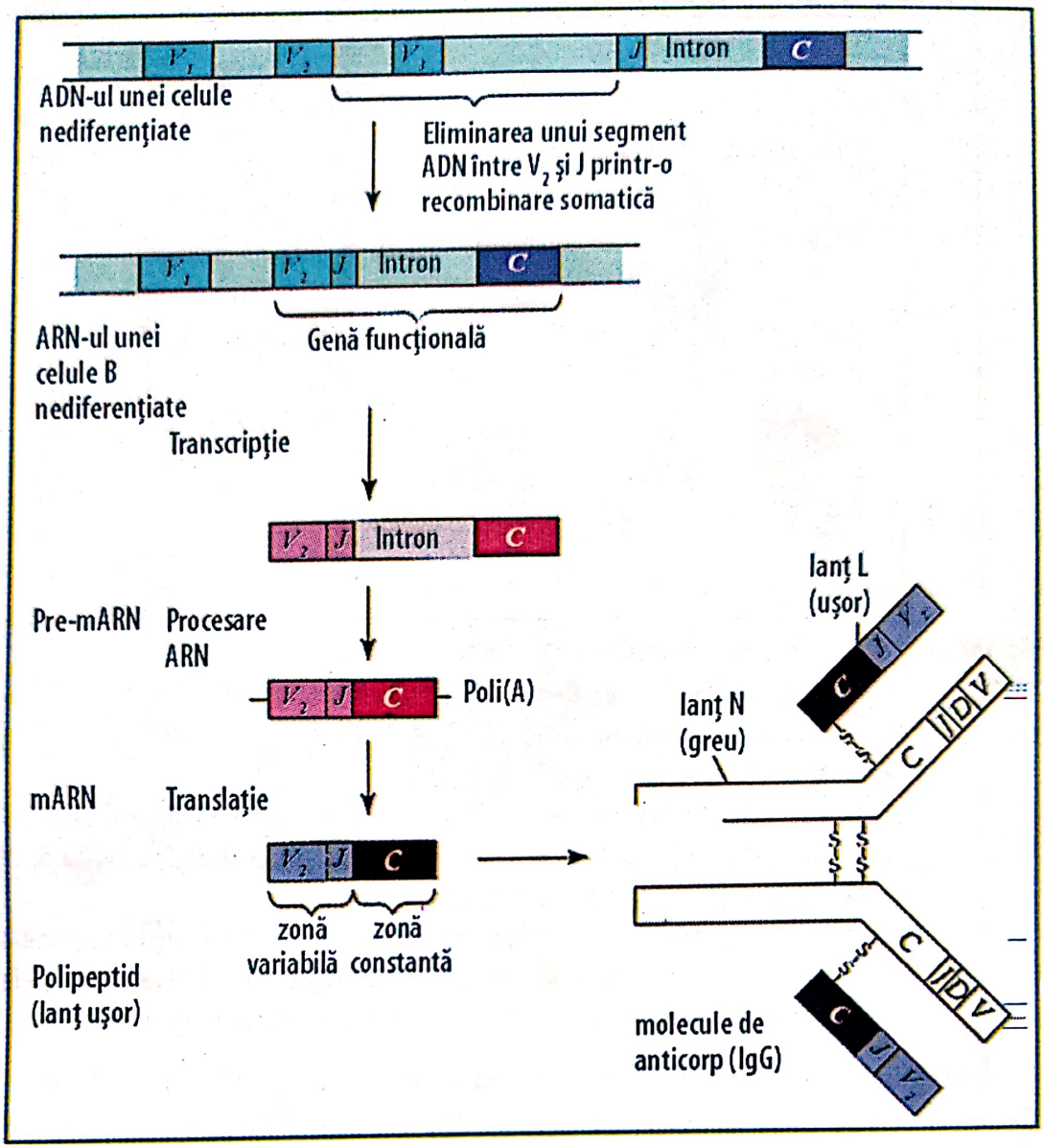


Fig. 145 – Modelul de formare a imunoglobinei prin recombinare somatică a genelor acesteia. ADN-ul genelor anticorp ale celulelor nediferenţiate poartă segmente codante care însumează circa 250 variante marcate în desen cu litera „V" (segmenţi de gene V). În desen sunt marcate numai trei. ADN-ul deţine şi mai multe segmente de gene „J" (de la englezul *joining* pentru legat) şi una sau mai multe constante „C" (de asemenea segmente de gene codante). Cu ocazia diferenţierii anumitor celule albe ale sângelui denumite şi limfocite B sau celule B, este eliminat un segment lung de ADN care se întinde de la finalul unui segment V până la începutul unui segment J. Această eliminare aduce segmentul interesant V - în cazul nostru V_2 lângă segmentul J. În felul acesta se naşte o genă de transcripţie. Transcriptul mARN primar va fi procesat prin îndepărtarea intronului şi a altor segmente care deranjează *(prelucrare după Campbell A.N., 2000)*

mARN-ul care rezultă este translatat într-un polipeptid care reprezintă lanţul uşor al unei molecule anticorp. Segmentele codante care provin din V şi J produc aminoacizi care apoi alcătuiesc segmentul variabil al polipeptidelor (zona variabilă). În acelaşi timp, segmentul C codează zona constantă. Aglomerarea întâmplătoare a 250 V şi 4 J - segmente oferă pentru acest tip de lanţ - L (aşa-numitele N-L-lanţuri) 1000 de posibilităţi diferite de combinaţii.

Scanned with OKEN Scanner

Şi în timp ce zona variabilă a lanţului uşor al moleculei anticorp cu ajutorul a două segmente de gene (V şi J) codează 1000 posibilităţi de combinaţii în cazul lanţului greu, trei segmente de gene (V, D şi J) oferă în total 30.000 de posibilităţi de combinaţii. Combinaţia liberă a lanţurilor grele şi uşoare într-un „braţ" al moleculei anticorp oferă deci o variabilitate de 30 milioane de tipuri diferite. Această variabilitate creşte parţial prin mutaţii somatice ca urmare a unor recombinări posibile pentru circa 10^{11} posibilităţi.

Această cifră este cu mult mai mare decât poate utiliza un om într-o viaţă şi explică nu numai diversitatea imuno-răspunsului humoral, ci şi modul în care anticorpii pot să fie produşi împotriva unor asemenea antigene. Până acum natura nu ne-a putut oferi un asemenea exemplu ca la om.

În genomul unei celule embrionare regiunea, zona care codează partea constantă a polipeptidelor imunoglobinice, este separată de regiunea în sine printr-un fragment ADN care codează la rândul său sute din segmentele care lucrează în regiunea variabilă odată cu maturarea unei limfocite B, se uneşte un segment specific şi variabil al ADN-ului cu un segment constant iar ADN-ul poziţionat între ele este eliminat.

Cele 2 segmente de-acum unite formează o înşiruire de nucleotide, adică o genă, o genă nouă care codează polipeptidul-imunoglobinic. O mare parte a variabilităţii anticorpilor este determinată de diferitele posibilităţi de combinare ale segmentelor variabile implicate în codificarea imunoglobinelor.

O contribuţie importantă la crearea unor molecule anticorpi solide şi sănătoase îi aduc de asemenea şi numeroasele posibilităţi de combinaţii ale lanţurilor polipeptidice grele şi uşoare. Formarea unor imunoglobine funcţionale demonstrează în ce măsură modelarea segmentelor de ADN, adică membrana lor somatică, poate conduce la crearea unor celule somatice, cu funcţii extrem de diferite. ■

4.4.7.4. Alte modificări chimice ale genomului

Este necesar să amintim aici şi de modificarea unor baze azotate ale ADN-ului prin metilare. Metilarea ADN-ului presupune cuplarea unei grupe metil ($-CH_3$) la bazele ADN-ului după sinteza acestuia. ADN-ul numeroaselor plante şi animale deţine baze metilate, cel mai frecvent se întâmplă acest lucru cu citozina. Circa 5% din citozina inclusă în ADN-ul eucariotelor este metilată. ADN-ul inactiv, cum ar fi de exemplu cel din corpusculii Barr, prin comparaţie cu ADN-ul transcriptibil, este cel mai adesea puternic metilat, dar se recunoaşte şi existenţa unor excepţii. Comparaţia aceleiaşi gene prezente însă în tipuri diferite de celule (aparţinând de exemplu diferitelor ţesuturi) a demonstrat că incapacitatea de exprimare a genelor din aceleaşi celule se datorează metilării puternice a citozinei lor.

Există însă anumite substanţe chimice care pot inhiba metilarea şi, în consecinţă pot conduce la reactivarea inclusiv a corpusculilor Barr, răspunsul acestora fiind corelat cu cromozomii „x". În această situaţie, întrebarea care se pune este aceea dacă metilarea ADN reprezintă un mecanism de reglare pe termen lung a exprimării genelor.

Scanned with OKEN Scanner

Răspunsul ar fi acela că metilarea ADN stimulează în anumite celule o exprimare diferențiată a genelor, suficientă pentru a fi caracteristică diferențierilor celulare. În anumite cazuri metilarea poate fi întâlnită și la diviziunea mitotică a celulelor.

Celulele clone care rezultă, formează țesuturi speciale, care reprezintă, firește, o „dovadă chimică" pentru existența unor procese regulatorii în timpul dezvoltării embrionare și o nouă bază științifică pentru dezvoltarea biotehnologiilor. ■

4.5. CANCERUL ȘI EXPRIMAREA GENELOR

Un organism care are cancer este un organism modificat genetic și cu atât mai mult un organ sau un țesut. Cancerul este urmarea unei exprimări anormale a genelor care regularizează creșterea și diviziunea celulară așa cum s-a văzut deja în capitolul de început al acestei cărți. Anumite gene coordonează creșterea și diviziunea celulelor ca și apariția unor mutații. Dacă modificarea expresiei acestor gene are loc în celulele somatice, ele pot conduce la apariția cancerului. Mutațiile pot fi și spontane provocate de numeroase cauze pe care deja le-am comentat. Este bine însă să ni le reamintim.

a) **Cauze generate de factorii de mediu** în care, mai ales pentru eucariotele vertebrate mamifere, intră și alimentația.

- factori de natură fizică, precum razele röntgen, alte raze solare după expunere îndelungată;
- factori de natură chimică, anumite substanțe chimice care pot fi induse în corp prin contact, prin respirație sau alimentație (derivați cloro-ciclocarbonați, derivați epoxi, unele pesticide și mai ales unele mico sau bacteriotoxine).

b) **Factori de natură biologică și îndeosebi virusurile**

Virusurile sunt cele care provoacă carcinoamele și deși există o corelație directă între carcinogeneză (formarea tumorilor) și cancer, acesta din urmă poate fi depistat prin studierea prin metode speciale a acestor tumori provocate de anumite virusuri. Confirmarea existenței cancerului în lumea științei biologiei moleculare a fost efectuată odată cu descoperirea **genelor care îl provoacă și care au primit denumirea de oncogene** (de la grecescul *oncos* - tumori inflamate).

Harold Varmus și Michael Bishop, laureați ai premiului Nobel pentru decoperirile lor, au constatat că în cazul anumitor virusuri-ARN (retrovirusuri) se află aceste oncogene care conduc la creștere necontrolată la celulele infectate ale unei culturi.

Alți cercetători au descoperit segmente de gene, ale oncogenelor virale în genomul omului și al animalelor. Aceste gene apar ca normale în celule și au fost denumite **proto-oncogene**. Ele codifică numeroase proteine care **în mod normal** reglementează creșterea, diviziunea și adeziunea celulelor. O asemenea proto-oncogenă are deci o funcție importantă în celulă. Și totuși ea poate, în anumite condiții, să se transforme într-o oncogenă și să declanșeze cancerul. Acest lucru se întâmplă în următoarele condiții:

- fie are loc o creștere a exprimării acelora dintre ele care codifică proteinele;
- fie are loc o activare a acelorași gene, prezente ca inactive, liniștite în genom.

Scanned with OKEN Scanner

Există 4 modele de mutageneză care pot transforma o proto-oncogenă într-o oncogenă (fig. 146), şi anume:

- amplificarea genelor, este vorba de creşterea excesivă a numărului de copii;
- translocaţia cromozomală;
- transpoziţia genelor;
- mutaţiile punctuale.

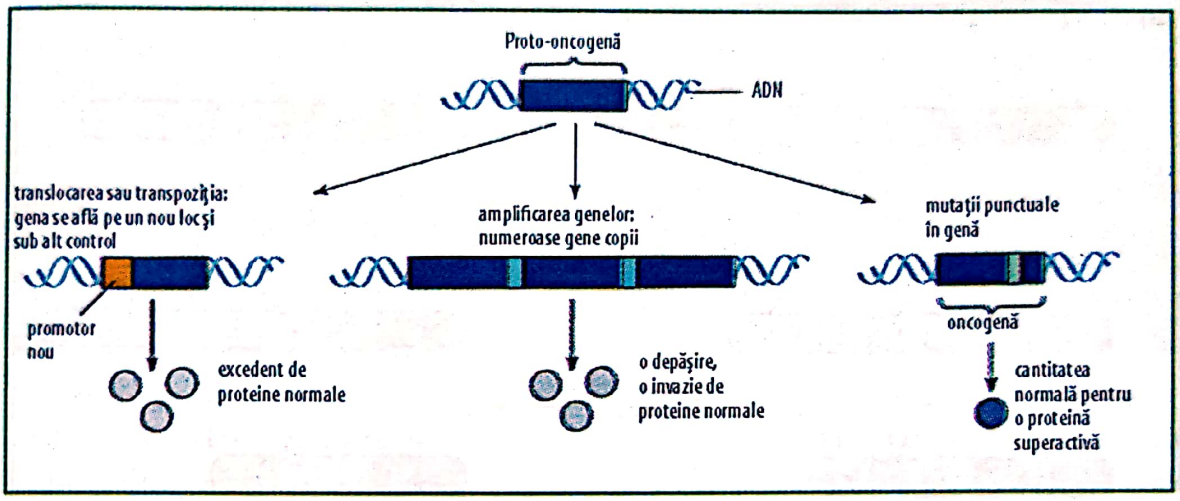


Fig. 146 – Transformarea prin mutaţie a protooncogenei în oncogeneză (*prelucrare după Marx J., 1994*)

S-a demonstrat deja că în cazul amplificării oncogenele în final ocupă un număr extrem de mare în celule. În celulele maligne se observă frecvent fragmente de cromozomi translocaţi. Aceasta înseamnă că segmentele cromozomale sunt decuplate şi şi-au căutat un loc nou pe un alt cromozom (fig. 147).

Una din proto-oncogenele translocate în acest fel pot apărea pe o nouă poziţie în spatele unui promotor activ sau pe o altă regiune, zonă de control, ca apoi prin stimularea transcripţiei să apară oncogena. În cazul transpoziţiei, o proto-oncogenă ar putea prin şi cu ajutorul unui transpozon să fie adusă pe o nouă poziţie a genei şi pusă sub controlul unui promotor activ special.

O mutaţie punctuală ar putea transforma o proto-oncogenă într-o formă de oncogenă, noul produs genetic fiind o proteină activă care stimulează puternic creşterea sau una rezistentă la degradare, la descompunere.

REŢINEŢI! **Toate aceste mecanisme pot să crească activitatea unei proteine regulatorii şi să provoace o creştere aberantă a celulelor şi o diviziune necontrolată, cu alte cuvinte celule normale se transformă în celule tumorale.**

Alte cauze ale cancerului ar putea fi oferite de modificări ale genelor ale căror produse (altele decât cele normale) ar putea să inhibe diviziunea celulară. Aceste gene sunt denumite **gene tumour - suppressor** (de la englezescul suppress - a reprima), adică suprimă activitatea anormală a genelor. Genele II-S în mod normal codifică ţinerea sub control a înmulţirii necontrolate a celulelor. Cum apare însă cancerul în acest caz?

Scanned with OKEN Scanner

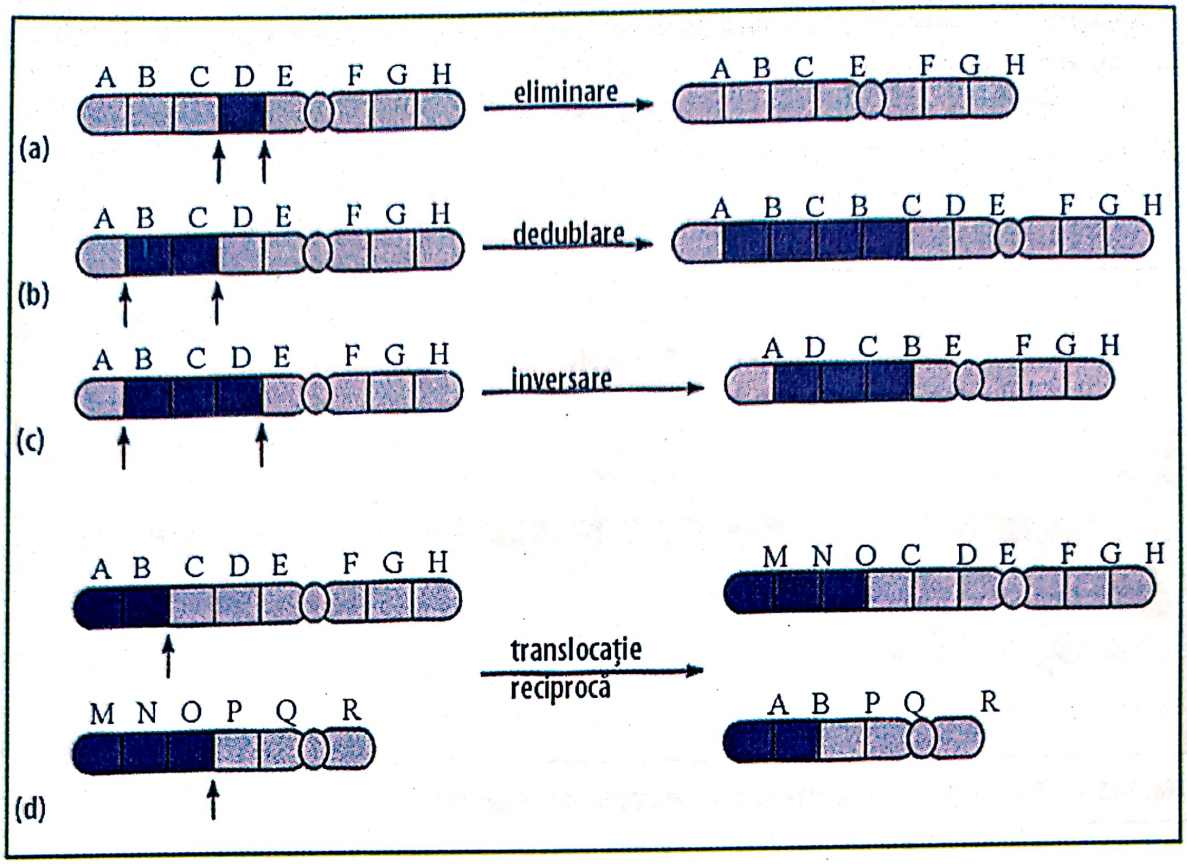


Fig. 147 – Modificări ale structurii cromozomale prin mutații.
Săgețile marchează punctele de ruptură ale cromozomilor. Genele obținute din dezordinea cromozomală sunt marcate cu culori închise.
a) O eliminare, o decupare îndepărtează un segment de cromozom.
b) O dedublare (duplicare) conduce la repetarea unui segment cromozomal.
c) O inversare face ca segmentul unui cromozom să fie înlocuit cu altul.
d) O translocație înmagazinează un segment de cromozom pe un cromozom neomolog. Cea mai frecventă translocație este cea reciprocă pentru segmentele cromozomale neomologe interschimbabile (spre deosebire de crossing-over unde se schimbă numai segmente de cromozomi omologi). Chiar și translocațiile nereciproce în care cromozomul cedat nu conține nici un fragment sunt implicate în mutații

Răspuns: fiecare mutație care reduce activitatea unei gene tumour-suppressor poate contribui la apariția cancerului, activitatea de stimulare a creșterii celulei prin îndepărtarea suppress-iei (adică a reprimitivității). Științific, prima mutație identificată într-o genă tumour-suppressor a fost descoperită într-o alelă ce determină formarea blastomului retinic. Conformația, starea homozigotului pentru această alelă conduce la formarea unor rețele de tumori canceroase la copii. Acest lucru a fost demonstrat în laborator pe culturi de celule. Dacă în celule cu una din versiunile mutației este introdusă o alelă normală a acestei gene, celula se cuplează imediat pe o „creștere canceroasă".

Mai trebuie precizat faptul care poate complica problema pentru cercetătorii care caută soluția rezolvării cancerului pe calea inhibării mutațiilor, că, în general, exprimarea genelor în favoarea declanșării cancerului necesită mai mult decât o mutație, pentru

Scanned with OKEN Scanner

a îndeplini toate modificările legate de acest fenomen. Aceasta poate să explice de ce frecvența apariției cancerului crește cu înaintarea în vârstă. Dacă cancerul reprezintă o înșiruire de acumulări de mutații, iar mutațiile se petrec, au loc, de-a lungul întregii vieți, se presupune că vom acumula cu atât mai multe mutații cu cât vom înainta în vârstă. Cu creșterea în vârstă crește nemijlocit și probabilitatea ca fiecare celulă să facă cunoștință cu mutațiile a căror transformare în cancer devine aproape o necesitate.

Observația conform căreia neapărat mai multe mutații conduc spre instalarea cancerului, poate explica predispoziția genetică pentru anumite tipuri de cancer în anumite familii. Să analizăm în acest sens modul de moștenire al oncogenelor și al genelor tumour-suppressoare.

REȚINEȚI!

Deoarece oncogenele apar printr-o stimulare foarte accentuată a activității, a creșterii și înmulțirii, mutația poate provoca aceste modificări numai în una din cele două alele - proto-oncogene.

Altfel spus, mutația este dominantă. În cazul unei gene tumour-suppressoare reducerea sau pierderea activității genei poate conduce, de asemenea, la pierderea controlului genei. De aceea este probabil că alelele mutante ale genelor tumour-suppressoare să se comporte ca recesive, adică amândouă alelele trebuie să sufere mutația ca în felul acesta defectele coordonării creșterii să poată fi scoase în evidență. Predispoziția genetică pentru cancer poate deci să fie moștenită în forma unei gene tumour-suppressoare defecte. Un individ cu o genă tumour-suppressoare defectă reprezintă pentru manifestarea unei boli de cancer un pas înainte; asta înseamnă că este necesară o mutație în minus pentru a se declanșa o activitate anormală de creștere și diviziune celulară. În momentul de față se desfășoară extrem de numeroase cercetări pentru a se sesiza în timp util în viața unui individ aceste alele mutante care conduc la predispoziția genetică pentru anumite tipuri de cancer.

Destul de recent, cercetătorii au descoperit o genă mutantă tumour-suppressoare care în formă moștenită provoacă cancerul intestinului gros la 6% din femeile care provin dintr-o asemenea familie. Pentru 5 - 10% din cazurile cancerului de sân există, de asemenea, informații verificate privind predispoziția genetică în apariția lor. Femeile care provin din familii în care cancerul mamar a fost prezent au o mare probabilitate de a transmite această boală în descendență chiar indivizilor de vârstă mult mai tânără decât restul femeilor care primesc această boală.

Multe femei se îmbolnăvesc, de asemenea, și de cancer uterin sau ovarian. Mai mult de jumătate din tipurile de cancer mamar în mare parte au fost puse în legătură cu alela mutantă a cromozomului 17 (adică au fost determinate de această alelă). În anul 1994 cercetătorii au descris și caracterizat această locație genetică denumită BRC1 ("breast cancer") pentru cancerul mamar ca genă tumour-suppressoare. În același an cercetătorii au identificat o altă locație (locus), denumită BRC2, pe cromozomul 13, care este responsabilă de îmbolnăvirea prin transmitere ereditară a celeilalte jumătăți a femeilor cu familii deținătoare a genei T.S. Chiar și la femeile care nu au purtat o încărcătură genetică a acestei boli au putut fi observate mutații somatice în alelele BRC1 și BRC2.

Scanned with OKEN Scanner

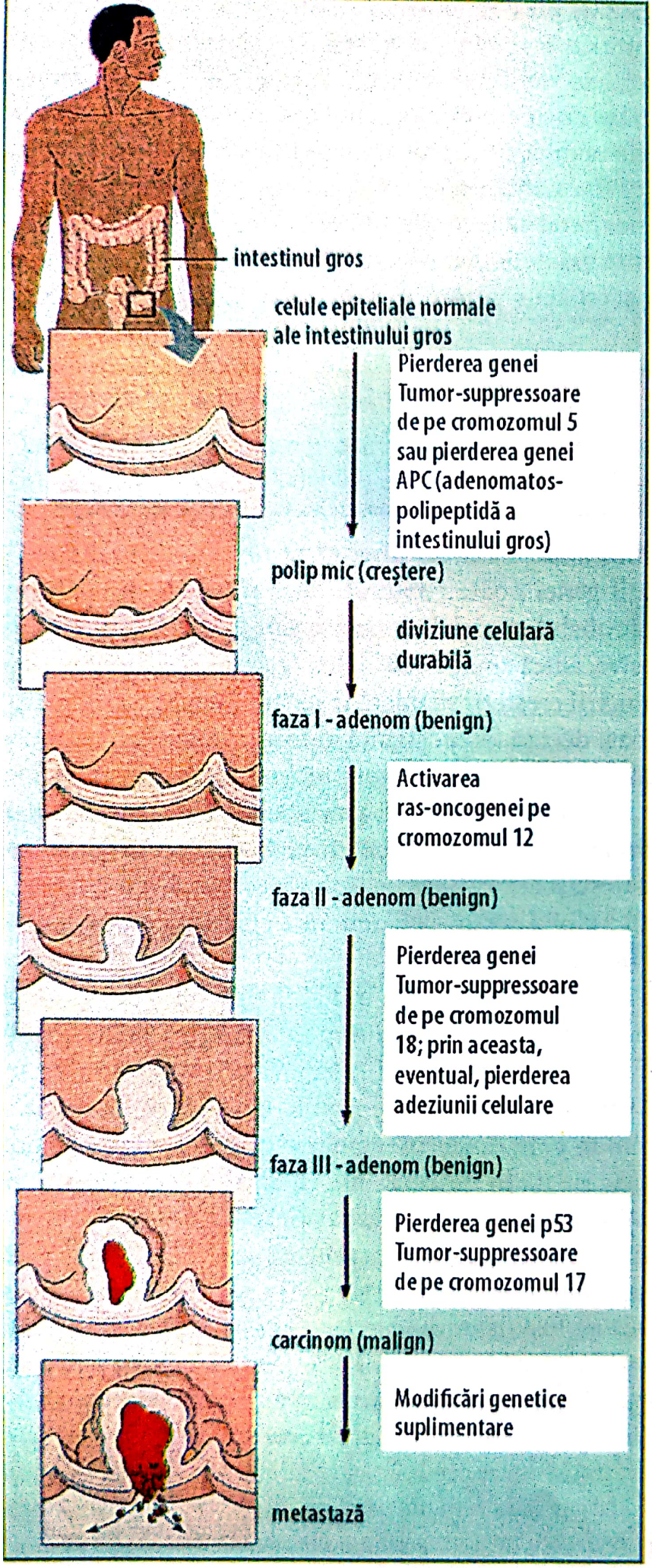


Fig. 148 – Modelul în mai multe trepte al dezvoltării cancerului de colon la oameni.

Paralel dezvoltării unei tumori şi în derulare se află o serie de modificări genetice, inclusiv mutaţii în genele tumour-suppresoare ale cromozomilor 5,18 şi 17, precum şi o mutaţie în aşa-numita ras-oncogenă). Cancerul poate să apară datorită unor serii întregi de evenimente cauzate de mutaţii. În fiecare caz se modifică mutaţiile genei care garantează o reglementare normală a creşterii celulelor şi ale înmulţirii acestora în direcţia dată, astfel încât să se obţină o ruptură, o blocare a activităţii regulatorii (*Campbell A.N., 2000 – prelucare*)

Scanned with OKEN Scanner

Studiul acestor gene, dar şi al altora care participă la apariţia cancerului de sân ar putea în final să conducă la noi dezvoltări pentru diagnoza timpurie şi tratamentul carcinoamelor mamare. Vor profita de acest lucru nu numai cazurile care se transmit prin moştenire, ci absolut toate, indiferent de modalitatea în care apar. Modelul „în mai multe trepte" al apariţiei cancerului este însoţit de unele cercetări efectuate pe unul din cele mai studiate forme de cancer, şi anume cancerul colonului.

Ca şi în cazul altor numeroase tipuri de cancer, este prezentată dezvoltarea în etape a metastazării unui cancer de colon.

Primul semnal este dat de o înmulţire deosebit de intensă a celulelor epiteliale mucoase aparent normale ale intestinului gros. Etapa următoare constă în apariţia unor tumori benigne sub formă de polipi, care în final evoluează spre o tumoră malignă.

Aceste modificări celulare au loc în paralel cu acumulările de mutaţii în oncogene şi genele tumour-suppressoare. Numai după ce se ajunge la un anumit număr de mutaţii în aceste gene se trece la formarea unei tumori maligne bine delimitată. În cele mai numeroase cazuri este necesară crearea a patru mutaţii care să conducă la activarea unei oncogene şi inactivarea celei de-a 3-a gene tumour-suppressoare. Circa 15% din cazurile de cancer de colon provin din defecte în sistemul de reparaţie a ADN-ului. Un asemenea defect moştenit favorizează o acumulare rapidă a mutaţiilor care conduc la manifestarea cancerului.

Apare acum o altă întrebare: în ce constă participarea oncogenei la inducerea virusurilor de tip cancer care produc la oameni circa 15% din cazurile de cancer? Răspuns: virusul ar putea aduce în celulă o oncogenă suplimentară (amplificarea genelor) sau ar putea întrerupe într-un anumit mod ADN-ul celulei gazdă şi prin aceasta ar putea fi afectate, eventual activate, o proto-oncogenă sau o genă tumour-suppressoare.

Cu toate acestea şi în ciuda unui volum mare de cunoştinţe acumulate în domeniul geneticii de bază a bolilor de cancer, nu au putut fi încă puse la punct, nu au putut fi elaborate metode semnificative ale terapiei cancerului. Lărgirea cercetărilor în domeniul exprimării genelor din genomul eucariotelor va conduce la o mai bună înţelegere a controlului exprimării genelor sale. Metodele tehnologiei genetice pe care le vom cunoaşte în curând vor permite, pornind de la aceste cunoştinţe, să contribuie esenţial la rezolvarea problemei cancerului. Aceasta nu înseamnă că pentru omenire nu vor apărea alte probleme de sănătate. ■

Scanned with OKEN Scanner

5. BIOINFORMATICĂ

5.1. ABORDAREA PROBLEMEI

S-a prezentat până acum o cantitate importantă de informații care au la bază poate de peste 100 de ori mai multe cercetări în laborator și direct în natură și felul de a se manifesta al lumii vii, decât acum 10 ani.

Cantitatea uriașă a secvențelor de ADN decodate este de-a dreptul covârșitoare, iar cercetarea actuală lucrează, de asemenea, cu o viteză demnă de secolul XXI și mileniul III. Noi secvențe sunt descoperite și caracterizate la intervale extrem de mici. Fără computere de putere imensă ar fi imposibil ca această enormă cantitate de date să fie stocată ca apoi să fie pretutindeni accesibilă cercetătorilor.

Bioinformatica este un domeniu științific într-o dezvoltare extrem de rapidă prin folosirea tehnicilor informaționale (a computerelor) care se ocupă cu colectarea secvențelor de proteine și ADN, ordonarea și studiul lor în cele mai profunde detalii.

Cele mai importante „date de bancă" în care aceste secvențe sunt înmagazinate sunt denumite **bănci de gene** și sunt prezente ca locație la „Los Alamos National Laboratory" și „EMBL" - Banca de date la „European Molecular Biology Laboratory" în Heidelberg. Aceste bănci de date schimbă în permanență între ele noile secvențe descoperite și eventual patentate pe care apoi le pun la dispoziția microbiologilor din lumea întreagă prin intermediul Internetului. Noile secvențe descoperite pot fi comparate cu cele înregistrate anterior în scopul stabilirii și cercetării așa-numitor secvențe omoloage.

Zonele codificate de către proteine pot fi traduse în secvențe de aminoacizi și la rândul lor se compară cu secvențele existente în banca de date și se constată dacă este degenerat codul genetic.

Proteinele învecinate adesea indică omogenități una față de alta spre deosebire de genele corespondente. Pentru dezvoltarea unor sonde care să se potrivească unui model mediu de mostrare pentru o bibliotecă ADN s-au dezvoltat între timp bănci de date cuprinzând secvențe parțiale - cADN (EST - bănci de date). ■

5.2. UTILIZAREA SECVENȚELOR DIN BĂNCILE DE SECVENȚE ADN POATE AJUTA LA PROGNOSTICAREA FUNCȚIILOR GENELOR NOU DESCOPERITE

Proteinele cu funcții asemănătoare conțin frecvent secvențe identice de aminoacizi omologi care corespund unor domenii funcționale ale structurilor proteice tridimensionale. Dacă o proteină este codată de către o genă nou clonată, indică astfel de omogenități cu proteinele celor mai cunoscute funcții și face posibilă deducția asupra „temelor" pe care gena trebuie să le îndeplinească.

Scanned with OKEN Scanner

5.2.1. Un exemplu din zona medicinei ne poate edifica asupra acestei probleme

Gena umană NF1 identificată prin metodele prezentate mai sus a fost clonată: mutațiile acestei gene (și acestea trebuie să fie cel puțin 4) sunt vinovate de producerea unei boli „de moștenire" denumită neurofibromatoză 1 și care dezvoltă în sistemul nervos periferic numeroase tumori. Înaintea clonării genei NF1 se cunoștea extrem de puțin despre bazele moleculare ale acestei boli. După izolarea, secvenționarea unei clone c-ADN care conținea gena NF1 secvențele aminoacizilor derivați ai proteinelor NF1 au fost comparate cu alte secvențe proteice existente în banca care conținea date despre gene. Comparația a demonstrat că un „spațiu" al NF1 este ocupat de proteine omoloage cu hifele proteice ale unei ciuperci cu prescurtarea **Ira**, aparținând ciupercii *Sacharomices cerevisiae* (fig. 149). Cercetări anterioare demonstrează deja că Ira este o proteină asemănătoare GAP (prescurtare de la GT Phase - active proteine sau Ras-proteine despre care s-a vorbit anterior). Această proteină reglementează funcția unui al doilea tip de proteină denumit proteină Ras.

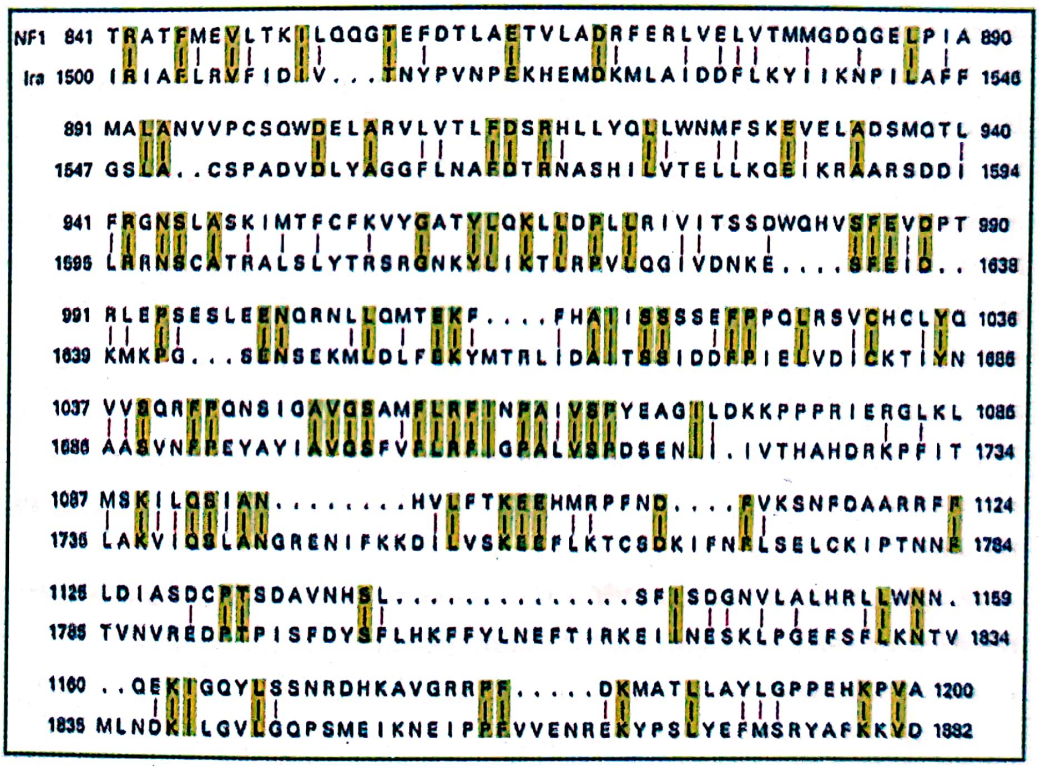


Fig. 149 – Comparație a secvențelor proteice umane NF1 și proteinele Ira ale lui Sacharomices cerevisiae într-un domeniu comun la amândouă proteinele de la care au fost înlăturate circa 180 resturi de aminoacizi, capete carboxil pentru a se demonstra o asemănare semnificativă (*după Xu și colab., 1990 – citați de Lodish și colab., 2001*)
Secvențele NF1 și Ira sunt alcătuite dintr-un cod de litere aparținând aminoacizilor (ex. T = treonin, R = arginină; A = alalină etc.). NF1 este localizat pe primul rând, iar Ira pe cel de-al 2-lea. Aminoacizii integral prezenți la cele două proteine au fost colorați (în galben). Aminoacizii chimic identici, dar care nu au lanțuri identice, pe o parte sunt legați cu o linie roșie. În stânga și în dreapta fiecărui rând sunt redate pozițiile aminoacizilor în proteinele respective. Punctele marchează „geluri" în secvențele proteice care s-au inserat, pentru ca asemănarea între aminoacizi în schema de mai sus să fie maximizată (*după Lodish și colab., Biologia moleculară a celulei, 2001*)

Scanned with OKEN Scanner

Această descoperire a constituit informația decisivă cum că gena Ras a oamenilor creează numeroase mutații în tumori. În același timp proteinele GAP și Ras regularizează creșterea celulelor și diferențierea lor ca răspuns la semnalele transmise de celulele vecine. În baza omologiei secvențiale cu proteinele GAP se presupune că NF1 în mod firesc reglementează activitatea Ras. Proteina NF1 a fost în final exprimată cu metodele experimentale și descrisă ceva mai târziu asupra clonei genei NF1. De data aceasta s-a constatat că într-adevăr proteina NF1 reglementează funcțiile proteinei Ras. Ca urmare, pacienții (bolnavii) cu neurofibromatoză care dețin o genă defectă NF1 formează probabil o proteină mutantă NF1 în celulele sistemului nervos periferic care interacționează normal cu Ras și, ca urmare, într-un moment nepotrivit declanșează semnalul pentru diviziunea celulară. Urmarea constă, firește, în formarea tumorilor.

Un al doilea exemplu referitor la utilizarea bioinformaticii în medicină se referă la gena BRC1 despre care am scris deja mai sus, în cu totul alt context însă. Femeile care moștenesc o formă mutantă a acestei gene se vor îmbolnăvi cu mare probabilitate de cancer mamar înainte de 50 de ani. Gena BRC1 a fost și ea izolată prin metodele specifice de-acum cunoscute și care fac obiectul „analizei genetice în biologia celulară" (vezi cap. 8 din cartea „Biologia moleculară a celulei" de Lodish și colab. 2001). Bazându-se pe prezența mARN, un cADN s-a clonat și a putut să elaboreze în felul acesta secvența BRCA-1. Compararea acestor segmente complexe a indicat că proteina BRCA-1, deși pare îndepărtată, este totuși suficient de învecinată cu proteina Rad-9 aparținând lui *Sacharomices cerevisiae*, o proteină regulatorie a ciclului celular care coordonează diviziunea celulelor ciupercii. Pe baza acestei informații, numeroase laboratoare din lume au început să cerceteze dacă proteina BRCA-1 funcționează asemănător cu proteina Rad-9.

Aceste exemple scot în evidență cum se poate determina o boală cu transmisie genetică pe baza cunoștințelor de biologie moleculară. Recapitulând aceste etape, importante în depistarea unei boli ereditare, subliniem:

- identificarea genelor modificate;
- clonarea și secvenționarea acestora;
- compararea proteinelor codante cu alte secvențe înmagazinate în băncile de date genetice.

Acest proces prin care tot mai multe proteine sunt identificate chimic și funcțional poate fi lărgit numai prin creșterea puterii de lucru a computerelor și elaborarea unor noi programe pentru acesta. În felul acesta s-ar descoperi noi și semnificative relații între diferitele secvențe, clasificându-se totodată procedeele identificării importanței numeroaselor proteine pentru complexele evoluții ale sănătății oamenilor și plantelor. Ele constituie baza de primire a creării unor noi forme de organisme despre care se va vorbi mai târziu în această carte. ■

Scanned with OKEN Scanner

6. GENOMUL ŞI BIOLOGIA ORGANISMELOR

6.1. ABORDAREA PROBLEMEI

S-a demonstrat deja existenţa unor secvenţe genomice complete la diferite organisme, ceea ce permite astăzi analize comparative ale diferitelor genoame. Aceste studii asupra genomului au dus la apariţia unei noi discipline denumită genomică şi constituie astăzi o importantă ramură a bioinformaticii. Bioinformatica permite să se acumuleze şi să se elaboreze modele asupra biologiei unui organism sau micoorganism care practic nu poate fi crescut pe medii de cultură, chiar dacă foarte puţine proteine au fost cercetate sau poate n-au fost cercetate chiar deloc. Pornind deci de la informaţiile acumulate şi folosind programe de modulare cel puţin pentru 5 microorganisme, s-au putut „presupune" proteinele care influenţează funcţiiile de bază ale celulelor a căror secvenţă genomică este bine cunoscută. Pentru 3 dintre aceste microorganisme prezentate în tabelul 150, şi anume *Micoplasma genitalium, Methanococcus janaschi* şi *Hemophilus influenzae*, proteinele acestora nu au fost deloc studiate. Folosind însă metoda comparativă cu proteinele cunoscute ale unor organisme model, precum *Escherichia coli* şi *Sacharomices cerevisiae* care se situează pe secvenţe genomice comparabile s-a putut presupune componenţa lor proteică.

Deoarece *Micoplasma genitalium* conţine cel mai mic genom cunoscut prezent vreodată într-o celulă, în figura 151 este redată o prezentare grafică a întregului genom al acestui organism cu precizarea că toate spaţiile de citire deschise (Open Reading Frames) ORFs conţin mai mult de 100 de aminoacizi.

Pornind de la informaţia că *Micoplasma genitalium*, ca parazit prezent în căile urinare şi genitale ale primatelor, este foarte greu de separat de celulele gazdă ale eucariotei şi deci nu pot fi cultivate în medii de cultură folosind datele oferite de bioinformatică, s-a ajuns la concluzii foarte importante privind comportamentul genomului. De exemplu:

- Genomul lui *Micoplasma genitalium* codează puţine, mult mai puţine enzime ale metabolismului intermediar, prin comparaţie cu organismele care trăiesc libere aşa cum este *Escherichia coli*.

Enzimele lipsă creează ipoteza, în curs de verificare, că parazitul în cauză îşi sintetizează macromoleculele sale pornind de la produse intermediare pe care el nu le poate sintetiza, dar pe care le preia din citoplasma celulelor gazdă. În acest aspect constă de fapt şi efectul lor parazitar.

Microorganismul *Methanococcus janaschi*, aparţinând grupului specific *Archea*, a fost primul al cărui genom a fost în întregime secvenţionat. Acest organism la limita existenţei între pro şi eucariote este complet anaerob, dar foarte util în obţinerea gazului metan, adică în degradarea anaerobiotică a materiei organice. Trăind într-un mediu complet lipsit de oxigen el îşi procură energia prin reducerea CO_2 şi a H_2 cu formarea metanului. În general, acestui microorganism i-au putut fi identificate toate enzimele necesare derulării reductive a schimbului de substanţe. Compararea secvenţelor proteice, a altor bacterii şi eucariote care deţin funcţii asemănătoare au putut să aducă cunoştinţe esenţiale asupra evoluţiei acestor principale 3 grupe ale vieţii pe pământ.

Scanned with OKEN Scanner

Evaluarea numărului total al proteinelor şi numărul prezumtiv al funcţiilor celulare ordonate la câteva microorganisme al căror genom a fost deja definit (secvenţionat)

Însuşiri	Mycoplasma genitalium	Methanococcus janaschi	Hemophilus influenzae	Escherichia coli	Sacharomices cerevisiae
Lungimea totală a genomului (k.b.)	580	1660	1830	4640	12050
Numărul total al proteinelor*	470	1700	1700	4300	6200
Numărul proteinelor cu funcţii precizate** la (i)					
Metabolism	50	230	325	650	650
Producerea şi depozitarea energiei	40	130	140	240	175
Mecanisme de transport	40	60	150	280	250
Replicarea ADN, reparaţii, recombinaţii	40	90	110	120	175
Transcripţie	12	20	30	230	400
Translaţie	100	110	125	180	350
Poziţionarea proteinelor şi secreţia în celule	20	25	35	35	430
Structura celulară	10	40	110	180	250

Microorganismele mai sus prezentate aparţin bacteriilor cu excepţia speciei *Methanococcus janaschi* care aparţine grupei *Archaea* - adică microoganisme procariotice, foarte apropiate de eucariote, mai apropiate chiar decât bacteriile clasice.

Sacharomyces cerevisiae este un eucariot monocelular.

* Cifrele indicate pe al 2-lea rând reprezintă evaluări asupra numărului total al proteinelor care sunt active din punct de vedere al codificării în fiecare genom. Ele se referă la numărul unor secvenţe ADN desfăşurate sub formă de codoni tripleţi fără ca acestea să pătrundă în codonii STOP (stopare – finalizare, e vorba de transcripţie). Au fost luate în consideraţie şi puncte de plecare mai scurte (este vorba de secvenţe de codon) dacă acestea totuşi codează proteine importante. În limba engleză aceste zone de citire pot fi găsite pe diferite spaţii ale genomului legate de mARN şi polipeptide, fiind cunoscute sub termenul de „reading framer" (spaţiu de citire). Rareori apar secvenţe ORFs mai mari de 100 aminoacizi. De aceea alternativa pentru codare rămân polipeptidele.

** În tabelul de mai sus sunt cuprinse numai o parte din funcţiile proteinelor. Partea, procentul funcţiilor proteice indicate este diferit de la un organism la altul, şi anume: 87% la *Micoplasma genitalium*, la *Methanococcus janaschi* 83%, la *Hemophilus influenzae* 83%, la *Escherichia coli* 62% şi la *Sacharomyces cerevisiae* 65%.

Surse: Mraser C.M. şi colab. (1995), Science 270, pag. 397; Built C.J. şi colab. (1996), Science 273, pag. 1058; Fleischmann R.D. şi colab. (1995), Science 279, pag. 496; Blatner Fr. şi colab (1997), Science 277, pag. 1453; Goffean A. şi colab. (1996), Science 274, pag. 546. Vezi, de asemenea, Ladish H. şi colab. „Biologia moleculară a celulei", pag. 261 - versiunea germană, 2001, versiunea engleză, 2000 - W.H. Freeman and Company.

Cu *Haemophylus influenzae* lucrurile stau cu totul altfel. În competiţia ecologică există unele specii extrem de dăunătoare omului, una dintre acestea fiind chiar *Haemophylus influenzae*, unul din cei mai periculoşi patogeni ai omului. Secvenţele genomului acestei bacterii au fost în întregime deslușite. Microorganismul

Scanned with OKEN Scanner

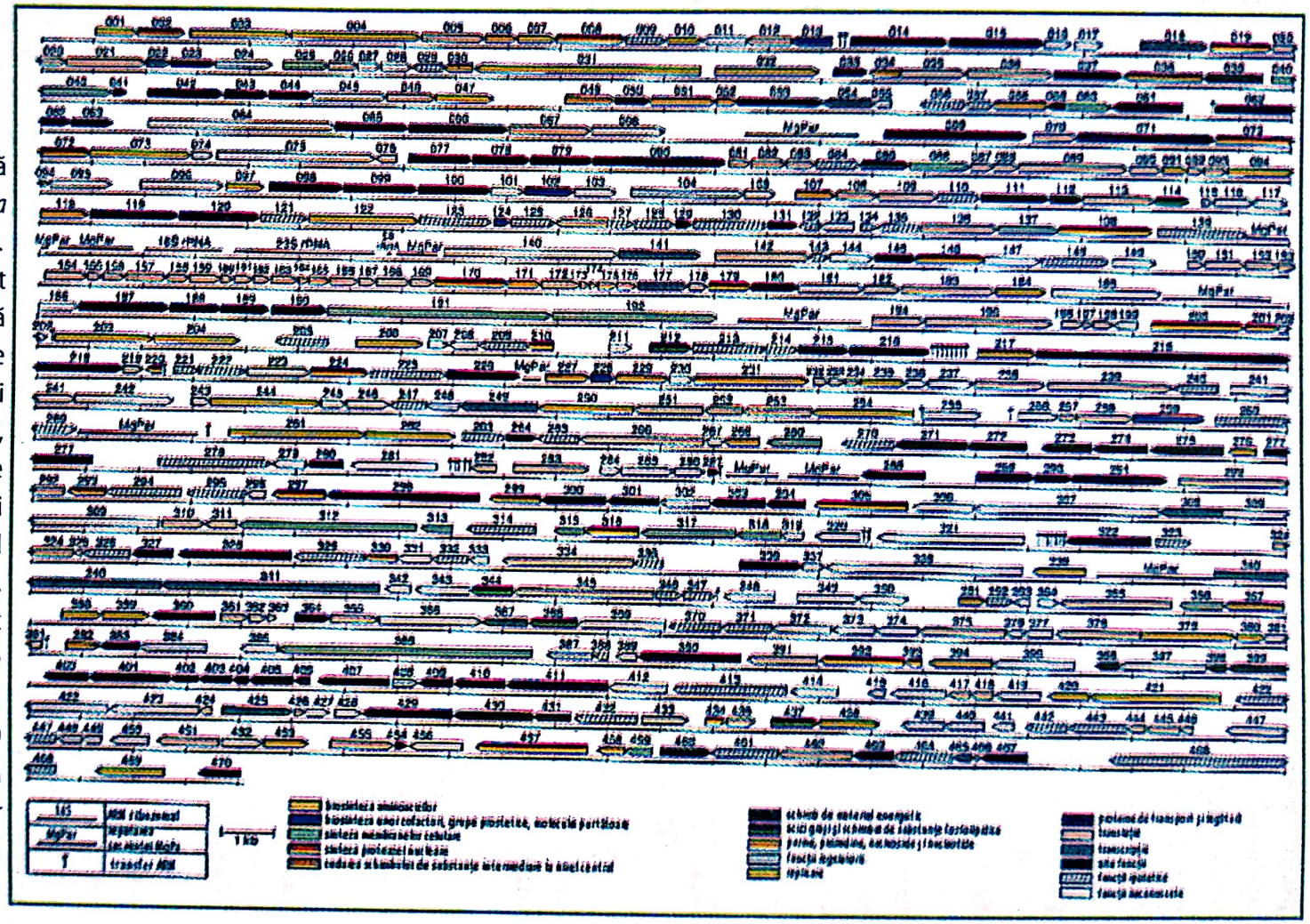


Fig. 151 – O prezentare schematică a genomului speciei *Mycoplasma genitalium* (*după Lodish şi colab., 2002*). Genomul circular închis este prezentat sub formă de linii. Fiecare secvență ADN definită ca spațiu de citire care codează 100 sau mai mulți aminoacizi sunt desenați ca niște grinzi, partea ascuțită indicând direcția de transcripție. Fiecare rând al schemei corespunde la 24 kb. Întreg genomul conține 470 secvențe ORFs lungi. Genele care codează proteine sunt colorate diferit în raport cu funcțiile prezumptive ale acestora. Până în prezent pentru circa 87% din cele 470 proteine care codează în acest genom au fost deja identificate (*sursă: Fraser M.C. şi colab., 1995 – Science 2002, pag. 397.*)

Scanned with OKEN Scanner

poate dezvolta o meningită bacteriană extrem de periculoasă care se sfârşeşte de regulă cu moartea individului atacat. Manifestarea bolii constă în inflamarea ţesuturilor membranei cerebrale, inclusiv a sistemului nervos central. Ca patogen, în mod normal, parazitul se află într-un contact intim cu celulele eucariote ale gazdei şi, prin consecinţă, aşa cum deja am arătat mai sus, îi lipsesc acestuia numeroase enzime necesare schimbului intermediar de substanţe care, spre exemplu, sunt prezente la *Escherichia coli* (bacterie liberă). Din aceste motive, ca şi în cazul lui *Mycoplasma genitalium*, *Haemophylus influenzae* nu poate să crească pe medii de cultură. Bioinformatica a făcut posibilă obţinerea unor informaţii extrem de complete despre genomul bacteriei şi în egală măsură a putut fi stabilită o terapie mai eficace împotriva infecţiilor pe care această bacterie le dezvoltă. Acesta este şi motivul principal pentru care folosind metodele bioinformaticii şi cunoştinţele acumulate în bazele de date, se lucrează acum intens la secvenţionarea genoamelor a numeroşilor altor patogeni bacterieni. ■

6.2. LĂRGIREA INFORMAŢIEI GENETICE PRIN PRELUCRAREA DATELOR OFERITE DE PROTEINELE ASEMĂNĂTOARE

Existenţa a 3 direcţii de dezvoltare celulară în cadrul microorganismelor a fost deja demonstrată de vreme suficient de îndelungată de către cercetători. Acestea sunt prezentate în figura 152.

Toate celulele prelucrează informaţia genetică în 3 faze:

- replicarea;
- transcripţia;
- translaţia.

Dacă urmărim atent materialul prezentat constatăm că din aceste trei sisteme de prelucrare a informaţiei genetice, translaţia poate fi considerată ca locul, sistemul universal, deoarece în acesta cele mai multe proteine ribozomale la bacterii archee şi eucariote sunt fără îndoială omoloage (până la identice). Cu toate acestea, ribozomii eucariotelor conţin câteva proteine care nu se regăsesc nici la bacterii şi nici la archee. Pe de altă parte, şi bacteriile deţin un număr redus de proteine ribozomale specifice. În fine, a 3-a situaţie întâlnită la archee (*Methanococcus janaschi*) este aceea că se întâlnesc câteva proteine omoloage eucariotelor dar care nu se întâlnesc la bacterii. Factorii de iniţiere şi alungire ai translaţiei ca şi enzima aminoacril-tARN-sintetază sunt identice, sunt, de asemenea, puternic analogi pentru replicile (perechile) eucariotelor.

Însuşirile caracteristice ale semnalelor peptidice în cazul proteinelor secretorii sunt identice la archee, bacterii şi eucariote. Acest lucru conduce logic la ideea că mecanismele foarte cunoscute care stăpânesc, coordonează activitatea membranelor şi a translocaţiei sunt de asemenea identice cu cele 3 direcţii de evoluţie.

Sistemele informative destinate replicării şi transcripţiei ADN-ului sunt similare la archee şi eucariote, dar se deosebesc într-o măsură încă nedeterminată la bacterii. Bacteriile, de exemplu, nu dispun de histone, în timp ce genomul speciei *Methanococcus janaschi* codează 5 histone, omologe cu histonele H1, H2A, H2B, H3 şi H4.

Scanned with OKEN Scanner

Această descoperire a condus la constatarea că în procesul de pliere, de împachetare a genomului, ca şi în cel de reglementare a transcripţiei, histonele ocupă funcţii identice la archee şi eucariote. Genoamele speciilor archee conţin gene destinate sintezei anumitor proteine ca factori de iniţiere ai transcripţiei în nucleul celular, care sunt omoloage eucariotelor. Aceste gene nu se întâlnesc însă la bacterii.

Cu ajutorul anumitor metode, au fost fabricate proteinele de tip archee şi apoi s-a constatat că acestea deţin funcţii asemănătoare cu cele ale „replicilor" eucariotelor.

Dimpotrivă, protinele transcripţionale ale micului genom ADN din cloroplaste şi mitocondrii sunt asemănătoare proteinelor transcripţionale ale bacteriilor.

Ribozomii cloroplastelor şi mitocondriilor se aseamănă, de asemenea, mai mult cu ribozomii bacterieni decât cu ribozomii citiplasmatici ai eucariotelor.

Aceste descoperiri ale genonicii au condus la concluzia că nucleul celulelor la celulele eucariote şi cel al archeelor s-au dezvoltat din acelaşi trunchi (punctul 2, fig. 152), în timp ce mitocondriile şi cloroplastele îşi trag originea din bacterii, care au avut o derulare comună de tip simbioză cu celulele eucariote.

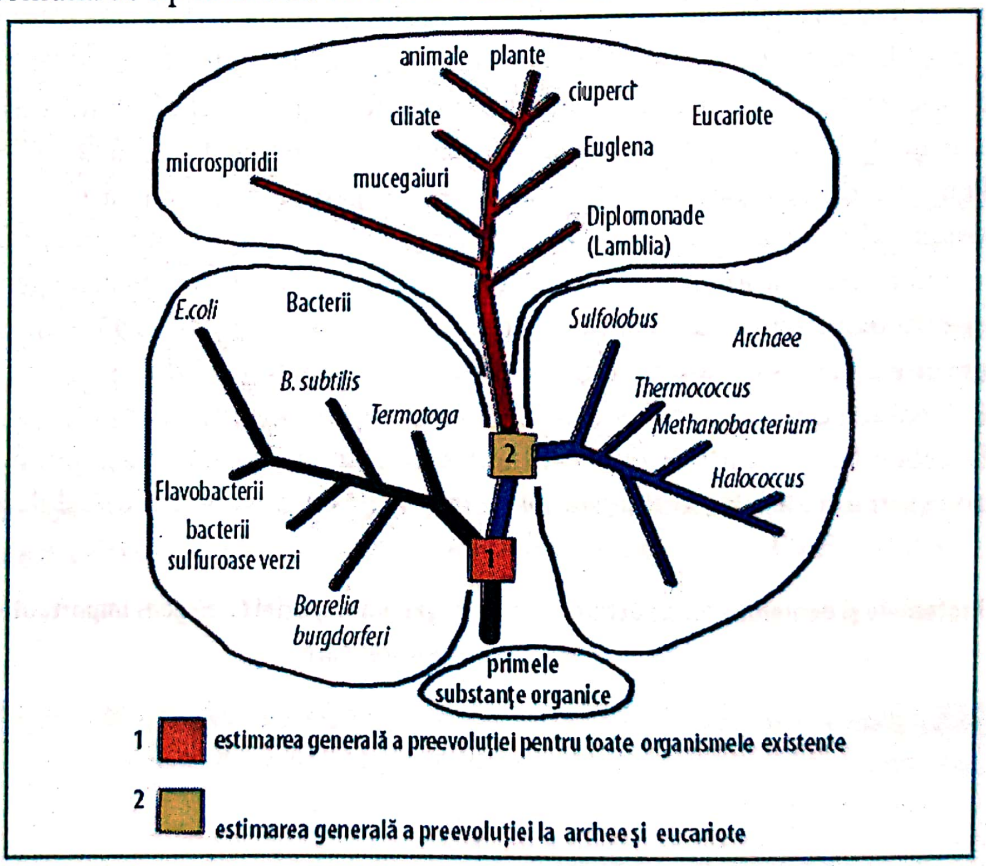


Fig. 152 – Schemă a celor 3 direcţii de evoluţie a organismelor pe pământ.
Faptul că toate organismele provin din acelaşi trunchi demonstrează unicitatea sau poate suprapunerea secvenţelor ribozomale ARNs sau poate faptul că sunt foarte apropiate. Liniile trasate oferă o privire asupra modului în care întreaga viaţă de pe pământ, de la bacteriile unicelulare până la cele mai complexe mamifere s-au dezvoltat dintr-un trunchi comun, dintr-o linie monocelular unică. Acest lucru înseamnă că o mare parte din informaţia genetică prezentă în trunchiul 1 se regăseşte în toate cele 3 grupe de organisme.

Scanned with OKEN Scanner

Faptul însă că spre deosebire de histone şi proteinele transcripţionale, numeroase proteine aparţinând speciei *Methanococcus janaschi* participă la menţinerea structurii celulare le face asemănătoare cu proteinele bacteriilor şi nu cu cele ale eucariotelor. Această logică demonstrează organizarea asemănătoare a structurilor ambelor linii ale celulelor procariotice, precum şi deosebirile structurale între acestea şi celulele eucariote. ■

6.3. LOCALIZAREA INTRACELULARĂ A PROTEINELOR ŞI A SECREŢIILOR LOR

Acest fenomen a fost semnalat la genele din hifele ciupercilor şi, aşa cum am prezentat mai sus, au un mare rol în definirea unor activităţi asemănătoare la om.

Genomul ciupercii *Sacharomices cerevisiae* a fost primul genom al unei eucariote aproape pe de-antregul secvenţionat şi deci identificat. Până în prezent peste 65% din genele acestei specii sunt cunoscute. Cunoscute sunt şi funcţiile pe care acestea le îndeplinesc. Dacă revedem datele din tabelul 153 constatăm că numărul proteinelor implicate în diferite funcţii este aproximativ acelaşi la *Sacharomices cerevisiae* şi *Escherichia coli*. Marea diferenţă constă însă în numărul total de proteine care sunt implicate şi coacţionează în localizarea intracelulară a proteinelor şi a secreţiei lor. În acest domeniu s-a constatat că ciuperca deţine de 10 ori mai multe proteine decât bacteria.

Pentru a determina funcţiile celor 35% din genele ciupercii care fie că nu sunt cunoscute, fie că fac obiectul unor ipoteze, se derulează în acest moment un proiect de cercetare internaţional care îşi propune sistematic inactivarea fiecărei gene. Descoperirile de până acum au creat senzaţie când s-a constatat că circa 45% din secvenţele genomului uman sunt asemănătoare cu cele ale ciupercii (*Ladish şi colab., 2001*). În 1998 a fost decodificat genomul speciei *C.elegans*, un mic organism pluricelular.

În tabelul 153 sunt prezentate funcţiile şi domeniile codate de genomul acestui vierme sârmă şi care sunt importante pentru toate organsimele pluricelulare.

Tabelul 153

Proteinele şi domeniile lor de acţiune codate în genomul speciei *C. elegans* importante pentru organismele pluricelulare

Funcţii cu caracter general	Proteine şi domenii	Nr. aprox.
Coordonarea transcripţiei	Domeniul separării furcilor şi homeo	540
Coordonarea prelucrării progresive a ARN	Domenii de cuplare a ARN-ului	100
Transmiterea semnalelor între celule	Către proteinele G receptori de cuplare chinase proteinice, tirofosfataze proteice	1200
Transmiterea impulsurilor nervoase	Prin neurotransmiţători, canale ionice regularizate	80
Formarea ţesuturilor	Colagen	170
Acţiuni dinamice de schimburi între celule	Asemănător EGF, domeniul imunoglobulinelor, transferare glicosil, lectine	330

Sursa: Science 282, pag. 2012 – The *C. ellegans* consortium.

Scanned with OKEN Scanner

În concluzie la acest capitol putem spune următoarele:

- Dezvoltarea puterii computerelor şi a elaborării unor programe de amploare a permis depozitarea, prelucrarea şi analiza unei cantităţi foarte mari de date secvenţiale -ADN care constituie baza unei noi discipline, **Bioinformatica.** Această bază de date stă numai la dispoziţia cercetătorilor autorizaţi care prin intermediul Internetului au acces la banca de date care cuprinde secvenţe genomice şi secvenţe cADN.
- Pornind de la această bază de date s-au putut stabili procedee de modulare care pot conduce la aflarea funcţiilor unor proteine, fără ca acestea să fi fost identificate pornind de la asemănarea genelor sau a cADN-ului cu secvenţe ADN, care codează proteine cu funcţii cunoscute. Computerele oferă prin simulare date atât de exacte încât nu mai este necesară munca laborioasă de laborator, mai ales pentru anumite bacterii parazite, care nu se lasă izolate şi cultivate pe medii specifice. S-au putut identifica, prin aceste procedee, gene care transmit boli ereditare, gene mutante care pot induce boli periculoase inclusiv cancerul, sau gene utile care trebuie preluate şi utilizate în tehnicile moleculare de îmbunătăţire a performanţei organismelor sau a protecţiei lor.
- Descifrarea, decodificarea completă a unor secvenţe genomice ale diferitelor organisme a creat o nouă subdisciplină denumită **genomică**. Scopul acesteia constă în **analiza şi comparaţia în totalitate a genoamelor cunoscute.**
- Genomica a demonstrat deja că pe cele 3 linii de evoluţie a organismelor există numeroase proteine asemănătoare care demonstrează unitatea lumii vii şi că linia archee se plasează între bacterii şi eucariote.
- Genomul eucariotei pluricelulare *Sacharomices cerevisiae*, decodificat în întregime, a arătat că, codează peste 45% din proteinele prezente în genomul uman. Codează totodată mult mai multe proteine care participă la localizarea intracelulară a proteinelor şi a secreţiilor.
- Aşa cum vom vedea în capitolul următor, aceste cunoştinţe sunt de o importanţă imensă pentru cei care lucrează în domeniul biotehnologiilor moleculare. ■

Scanned with OKEN Scanner

Partea a II-a

DEZVOLTĂRI PRACTICE ALE TEHNOLOGIILOR BIOMOLECULARE

Scanned with OKEN Scanner

1. TEHNOLOGIILE GENETICE

1.1. INTRODUCERE

Dezvoltarea cercetării în domeniul biologiei moleculare nu şi-ar fi avut sens dacă descoperirile acesteia nu s-ar fi dovedit extrem de importante pentru „dezvoltarea tehnologică" a lumii vii. La ce rost să cunoaştem descifrarea genomului plantelor şi animalelor dacă nu ne-am propune să utilizăm genele bune pentru inducerea unor caractere care să sporească eficacitatea organismelor utile şi să înfrâneze pe cea a organismelor dăunătoare. În consecinţă, astăzi, sute de produse genetice sunt fabricate în scop comercial, dar, firește, pentru fericirea omului.

Tehnologia genetică sau tehnica genetică (genetic engineering) se defineşte simplu ca „operaţiuni prin care genele sunt manipulate pentru a fi utilizate în scopuri practice". Deşi la prima vedere pare un lucru dificil, putem afirma că cel puţin în ultimii 15 ani a devenit deja **un lucru obişnuit**, practic o rutină, recoltarea genelor diferitelor organisme, chiar şi acelea din specii diferite şi aducerea lor în „vasele de reacţie" plasate în diferite laboratoare, unde sunt combinate unele cu altele pentru a rezulta un ADN recombinat care apoi este introdus într-o celulă golită de conţinutul ei genetic, unde este lăsat să se replice şi să se exprime. În ultimul timp vasele de reacţie din sticlă au fost înlocuite cu cele de plastic. Ca organisme gazdă pentru inocularea ADN-ului recombinat, pentru replicare şi exprimare este folosită bacteria *Escherichia coli*, preferata cercetătorilor, datorită uşurinţei cu care poate fi crescută în laborator şi a biochimiei ei extrem de cunoscută.

Dar definiţia şi preocupările tehnologiilor genetice nu se suprapun peste definirea biotehnologiei. Nu avem de-a face cu acelaşi lucru. Tehnicile genetice sunt elemente fracţionate care au condus la revoluţionarea biotehnologiilor industriale. Şi producerea iaurtului implică tehnici biologice, dar nu genetice. Ca urmare, termenul de biotehnologie genetică poate fi definit ca o înşiruire de procedee aparţinând tehnicii genetice care conduc la modificarea organismelor vii, în scopul obţinerii anumitor produse utile, sau a unor noi organisme utile, mult mai performante şi care n-ar fi putut fi obţinute prin alte procedee tehnologice. Numeroase procedee biotehnologice se cunosc de sute de ani, iar unele dintre ele se desfăşoară în natură fără controlul antropic. În afara fabricării iaurtului despre care am vorbit mai sus, drept procese biotehnologice mai pot fi considerate toate acelea care folosesc microorganismele naturale sau selecţionate prin metoda clasică pentru obţinerea unor alimente precum brânzeturile, salamuri speciale, vinuri, berea, oţetul etc., sau cele destinate obţinerii antibioticelor, sau cele destinate obţinerii unor anticorpi monoclonari prin folosirea unor tehnici imunologice moderne. Obţinerea unor soiuri sau hibrizi de plante mai productive a unor rase de animale mai performante aparţin de asemenea biotehnologiilor clasice. Tot acestora aparţine şi tehnica de obţinere a metanului din materiale organice supuse fermentării. ■

Scanned with OKEN Scanner

1.2. ETAPE ÎN BIOTEHNOLOGIILE GENETICE

Biotehnologiile genetice încep în paşi exacţi cu:

a) Modificarea in vitro a ADN-ului, adică o modificare a esenţei vieţii în afara organismului viu şi prin aceasta de la început se deosebeşte de biotehnologiile clasice.

b) Noua tehnologie este mult mai rapidă şi mai precisă şi oferă foarte multe posibilităţi de a schimba gene între organisme care sunt extrem de diferite precum bacterii, plante şi animale.

Biotehnologiile genetice au fost create pentru manipularea genetică a organismelor şi pentru fabricarea unor produse comerciale. Realizarea practică a acestor procedee are în spatele ei o imensă cantitate de cercetări şi rezultate care au condus la progrese enorme în cercetarea fundamentală de specialitate. Bioinformatica despre care am vorbit mai sus se ocupă cu sortarea, analiza, compararea şi introducerea în bazele de date a acestor cunoştinţe. Cercetătorii în biologie moleculară dispun astăzi de laboratoare şi instrumente de cercetare atât de evoluate încât cu numai 10 ani în urmă acestea ar fi fost considerate ca un vis nerealizabil. Această tehnică extraordinară, din care nu lipsesc nici cele mai performante computere din lume, a influenţat simultan dezvoltarea tuturor domeniilor biologice.

În materialul de faţă vom prezenta următoarele probleme:

- Folosirea tehnicilor genetice pentru obţinerea unor gene clonă folosite în cercetare şi industrie.
- Principalele „unelte" de realizare a tehnologiilor genetice precum: enzime de restricţie, ligase, vectori ADN şi organisme gazdă.
- Utilizarea tehnologiilor genetice pentru transferul genelor unei specii în genomul altei specii.
- Metode pentru analiza şi multiplicarea secvenţelor nucleotide, în scopul lărgirii procedeelor tehnologiilor genetice.
- Contribuţia tehnologiilor genetice în progresul enorm al altor domenii în biologie.
- Proiectul genom uman, un efort enorm al societăţii ştiinţifice internaţionale destinat cartării şi secvenţionării propriului nostru genom.
- Tehnologiile genetice – o revoluţie reală pentru medicină şi industria farmaceutică.
- Tehnologiile genetice deschid noi căi în dreptul medical, în protecţia mediului şi în agricultură.
- Tehnologiile genetice pun în discuţie probleme importante de siguranţă precum şi dezbateri consistente asupra eticii lor. ■

1.3. CLONAREA GENELOR PENTRU UTILIZARE ÎN CERCETARE ŞI INDUSTRIE

Aşa cum s-a văzut din capitolele anterioare şi în mod deosebit din cel care a prezentat genele şi efectele lor, cercetările au demonstrat că există un număr foarte mare de procedee care conduc la modificarea genetică a unui organism, dar principiul teoretic fundamental al tuturor acestor metode rămâne acelaşi (fig. 154).

Scanned with OKEN Scanner

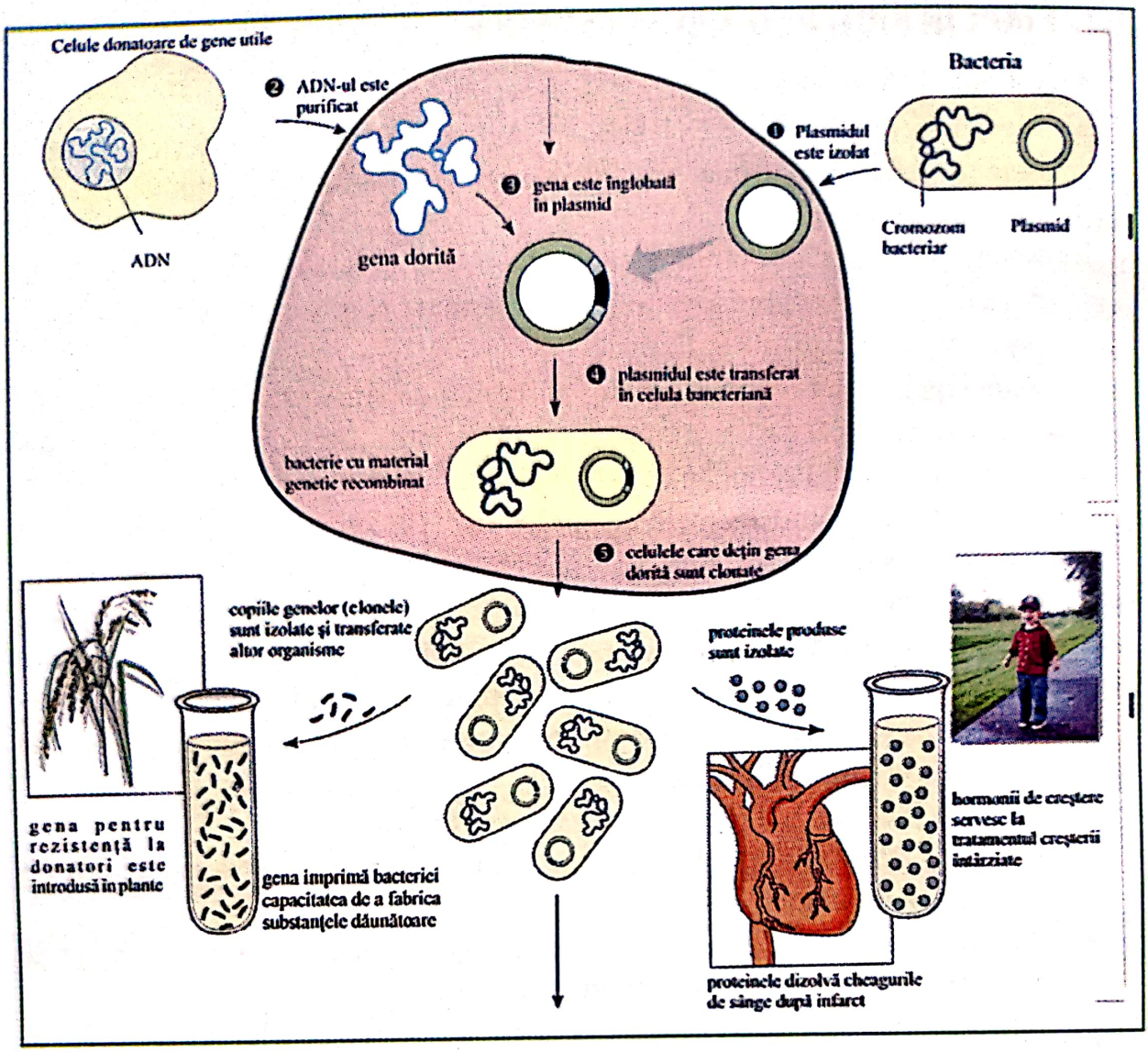


Fig. 154 – Schemă generală a producerii clonelor și transferului genelor utile.

Principiul producerii clonelor se bazează pe utilizarea plasmidelor despre care s-a discutat în capitolul anterior. Schema este împărțită în 2 segmente I și II. În segmentul I are loc procesul de recombinare și formare a clonelor în următoarele faze:

1. Specialistul în tehnică genetică izolează prin metodele mai sus prezentate ADN-ul plasmid din bacterie.
2. Este extrasă și purificată gena utilă (de interes) dintr-o celulă donatoare a altui organism (bacterie, plantă sau animal). În desen gena provine dintr-o celulă cu rezistență la dăunători (vezi fig. 150) sau o celulă umană care codează hormonii.
3. Fragmentul ADN care conține gena de interes este inclusă într-un plasmid, rezultând un ADN recombinat.
4. Plasmidul este transferat în celula bacteriană transportoare după ce aceasta a fost pregătită în acest sens.
5. Această bacterie modificată genetic va fi înmulțită prin cultivare. ADN-ul străin introdus în celulă prin intermediul plasmidului nu influențează negativ multiplicarea celulei ci se înmulțește simultan cu propriul ei ADN. Cultura bacteriană conține după un anumit tip copii ale genelor (în general una per bacterie). În josul figurii sunt sugerate 2 exemple în care genele utile pot fi implementate după izolare din cultura amestec. Este vorba de inducerea genetică a rezistenței plantelor la dăunători și inducerea genetică a producției hormonilor de creștere sau a proteinelor care dizolvă cheagurile de sânge (*Berca M., 2004*)

Scanned with OKEN Scanner

Dacă se urmăreşte atent această figură şi se compară, de exemplu cu o schemă clasică de formare a hibrizilor, în partea superioară a figurii constatăm o anumită similitudine. Din stânga vine un anumit element genic, din dreapta un altul (vezi liniile consangvinizate la porumb), după care prin combinarea liniilor rezultă un H.S., iar în cazul nostru o bacterie ce conţine material recombinat. Similitudinea este însă numai aparentă, deosebirile fiind fundamentale. Nu le vom comenta aici.

Moleculele de ADN sub formă circulară care alcătuiesc plasmidele au capacitatea de a se înmulţi separat de genomul bacteriei, dar deţin o însuşire importantă, aceea de a primi alături de genele proprii şi segmente genetice străine. Folosind tehnici genetice bine elaborate plasmidele sunt mai întâi izolate din bacteriile gazdă.

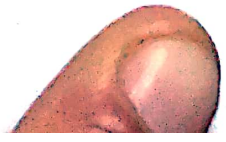
Folosind aceleaşi tehnici din celula care conţine gena dorită de interes, se extrage o secvenţă cuprinzând această genă care apoi se induce plasmidei izolate. Plasmidul dotat cu material genetic provenind din celule diferite, pare a fi un **hibrid**, căruia în acest caz îi spunem ADN recombinat. Acest plasmid, conţinând material genetic din 2 celule aparţinând unor organisme diferite este introdus apoi într-o nouă celulă bacteriană (a 3-a celulă care intră în joc), iar aceasta va fi supusă procesului de înmulţire pe medii specifice.

Înaintea fiecărei diviziuni, o dată cu replicarea plasmidului celulei, ADN-ul recombinat este şi el duplicat (dedublat). În condiţii speciale sau datorită unor premize date o asemenea cultură bacteriană poate produce şi proteine, acestea fiind codate de către gena străină (cea utilă) Noua formă de ADN hibrid recombinat este denumit ADN-clonat sau genă clonală şi poate avea numeroase căi de utilizare.

În cazul prezentat în figură întâlnim 3 categorii de avantaje de bază şi anume:

a) Fabricarea unor produse proteice, cum ar fi de exemplu cele care alcătuiesc hormonii umani de creştere (aceştia servesc pentru tratarea copiilor care nu cresc normal, a piticilor).
b) Fabricarea unui alt grup de proteine destinate activării ţesuturilor plasminogene, adică cele care dizolvă cheagurile de sânge şi asigură fluiditatea acestuia în urma unui infarct.
c) Obţinerea unor celule cu însuşiri speciale în schimbul de substanţe, însuşire pe care celula nu a avut-o anterior. În felul acesta se obţin, de exemplu, organisme modificate genetic care rezistă la atacul unor dăunători, de pildă porumbul sau orezul pot fi modificate genetic primind pe această cale o genă Bt (*Bacilus turigiensis*) care produce insecticidul în celulă şi apără planta de atacul oricărei insecte, dar în special o apără de pirală (*Pyraustra nubilaris*). Toate aceste avantaje prezentate mai sus sunt tot atâtea succese industriale prezente astăzi pe piaţa medicamentelor şi a producătorilor de sămânţă.

Un scop principal al clonării genelor constă însă în asigurarea de noi şi iarăşi noi produse genetice care să permită continuarea cercetărilor. Cele mai numeroase din genele de interes apar într-o singură copie per genom, iar acest lucru presupune că ea este amestecată cu un surplus de milioane de ori al ADN-ului nedorit. Posibilitatea clonării unor fragmente de ADN atât de rare şi prin aceasta înmulţirea lor din aproape în aproape într-un număr nelimitat constituie un valoros material în cercetarea biologiei moleculare. ■



Scanned with OKEN Scanner

1.4. MIJLOACELE DE OPERARE ÎN TEHNOLOGIA GENETICĂ

Pentru început ne vom rezuma la patru din principalele „unelte de lucru" utilizate în tehnologiile genetice. Acestea sunt:

- enzimele de restricție;
- ligasele;
- vectorii ADN;
- organisme gazdă.

Enzimele au un rol extrem de important. Ingineria genetică nu înseamnă deloc secționarea segmentelor de ADN cu ajutorul vreunui bisturiu sub un puternic microscop electronic. Așa ceva este imposibil, secționarea ADN-ului în anumite puncte se face exclusiv cu ajutorul enzimelor specifice. Descoperirea lor a făcut posibilă și apariția tehnologiilor genetice.

În forma lor cea mai simplificată putem spune deci că „chirurgia genetică" operează cu enzime, care pe de o parte „taie, secționează", iar pe de altă parte „leagă, sudează" diferitele segmente de ADN. În aparatura de lucru există și un „vehicul" care este definit de către „plasmid" cu ajutorul căruia se realizează ADN-ul recombinat și se induce replicarea acestuia.

Din marele număr de enzime implicate în tehnologia genetică unele dintre ele denumite **„enzime de restricție"** sau și mai exact **„endonucleaze de restricție"** sunt de o importanță deosebită. Ele sunt produse de anumite grupe de bacterii și au fost descrise pentru prima dată pe la sfârșitul anilor '60 ai secolului al XX-lea.

În natură acest grup de enzime protejează bacteriile împotriva ADN-ului altor organisme cum ar fi virusurile sau alte celule bacteriene. Acest lucru se realizează prin secționarea ADN-ului străin și agresiv printr-un procedeu care a fost denumit **„restricție"**.

Așa cum spuneam, cele mai numeroase asemenea enzime acționează foarte specific. Aceasta înseamnă că ele recunosc secvențe scurte, definite de secvențe nucleotidice ale ADN-ului pe care le secționează direcționat în interiorul acestor secvențe.

Celulele bacteriene își protejează propriul ADN împotriva „digestiei de restricție" prin cuplarea unei grupe metil (CH_3) la adenină și citozină în secvența de recunoaștere a enzimei de restricție.

Până în prezent au fost descoperite și izolate sute de asemenea enzime, iar multe dintre ele circulă pe piața produselor genetice putând fi obținute comercial.

În partea superioară a figurii 155 este prezentată o moleculă de ADN care poartă două secvențe de recunoaștere pentru o anumită enzimă de restricție. Secvența de recunoaștere a acestei enzime de restricție colorată în albastru închis este simetrică.

Același lucru este valabil și pentru 4 - 8 (în acest caz 6) nucleotide care se află poziționate pe cele 2 benzi ADN într-o orientare inversă. Enzimele de restricție taie legăturile covalente fosfatice pentru ambele benzi cu care ocazie adesea rezultă capete unibandă (formate dintr-o singură coloană ADN).

Scanned with OKEN Scanner

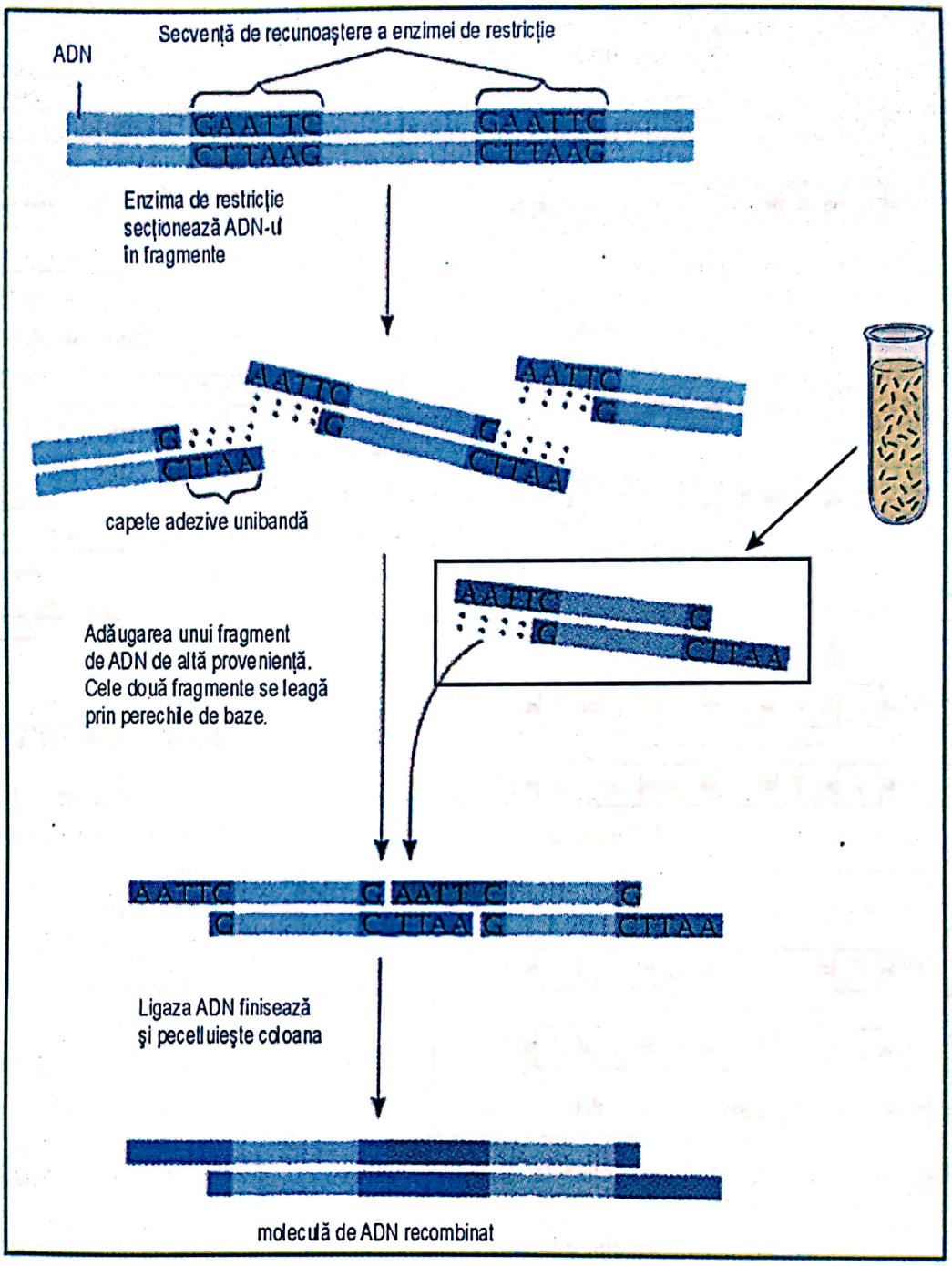


Fig. 155 – Utilizarea enzimelor de restricție și a ligaselor ADN în procesul de fabricare al ADN-ului recombinat. Se prezintă schematic enzima de restricție EcoRI. Ea recunoaște o secvență a celor 6 perechi de bază ale unui ADN și secționează dirijat în segmente zahăr-fosfat ADN-ul în cauză. Punctul decisiv îl constituie secvența de recunoaștere a unei coloane de ADN identice cu cea complementară dar numai în sens invers. Din cauza acestei simetrii a secvențelor enzimele de restricție produc fragmente unicoloană cu capete adezive. Capetele complementare se reunesc prin cunoscutele punți de hidrogen în noi perechi de baze. Alături se formează la început numai reuniri ale diferitelor fragmente străine ca origine sau sub formă de combinații și recombinații noi. În felul acesta fragmentele de restricție reunite lejer pot să sudeze covalent ligaza ADN. Prin această reunire a unor fragmente de origine diferită rezultă ADN-ul recombinat (*prelucrare după Campbell A.N. și colab., 2003*)

Scanned with OKEN Scanner

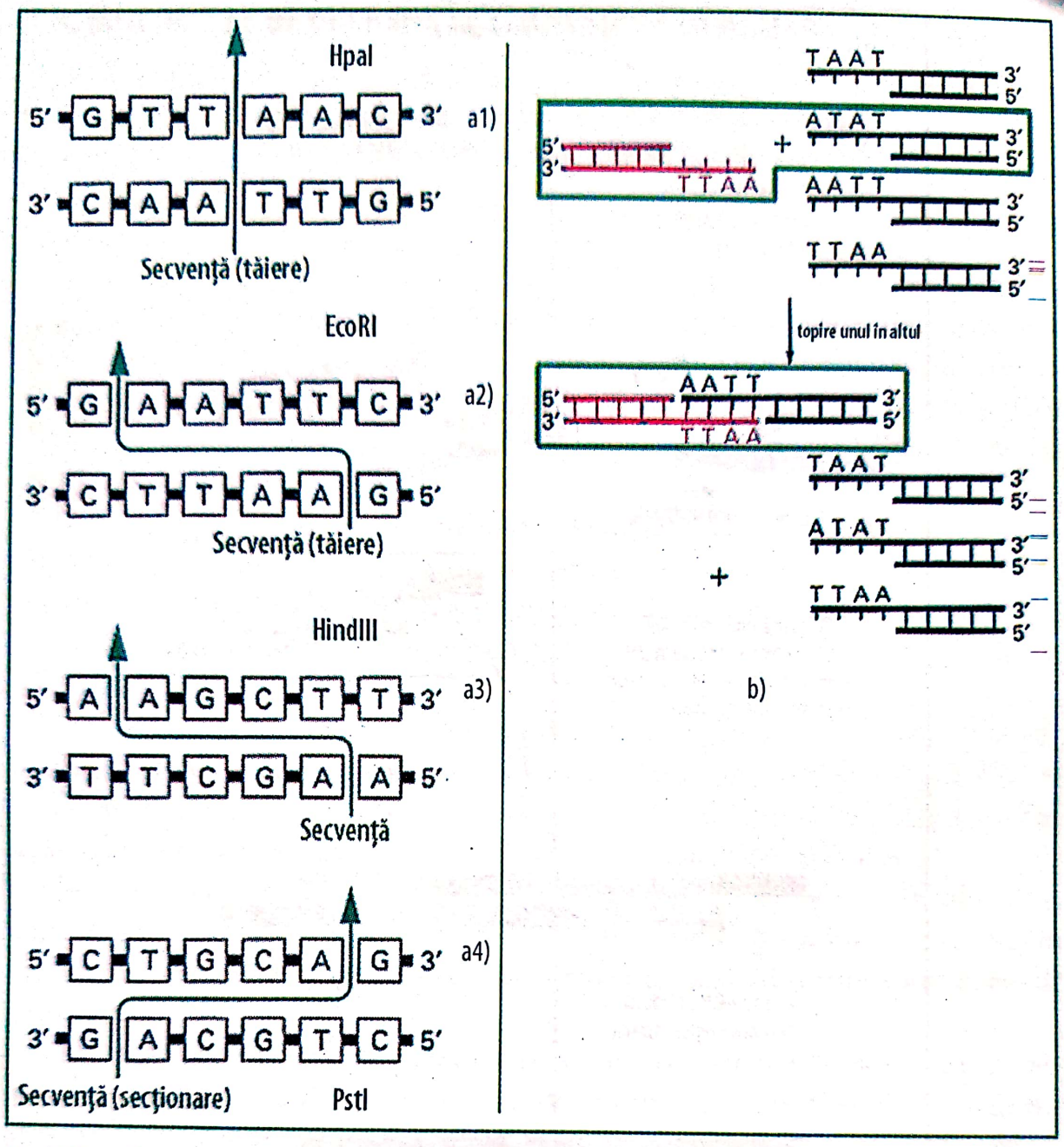


Fig. 156 – Formarea ADN-ului recombinat. Material genetic nou, de interes major *(prelucrare după Alberts şi colab., 2004)*

a) **Formarea capetelor adezive.** Secvenţele de nucleotide sunt recunoscute de către enzimele de restricţie specifice, care apoi secţionează ambele benzi ADN la locul de recunoaştere (a_1) sau foarte aproape de acesta (a_2, a_3, a_4). La unele enzime, cum este HpaI, capetele ce rezultă sunt egale şi abrupte (netede), iar la altele, precum EcoRI, HindIIII şi PstI, este un proces în trepte care conduce la fabricarea unor capete adezive. Enzimele de restricţie provin de la diferite bacterii. HpaI provine de la ***Haemophilus parainfluenzae***. EcoRI provine de la ***Escherichia coli***. HindIIII provine de la ***Haemophilus influenzae***. PstI provine de la ***Providencia stuartii***.

b) **Legarea prin capetele adezive.** Fragmentele ADN, odată formate, se pot reuni cel puţin câte 2 prin intermediul capetelor adezive cu condiţia ca ele să fie complementare. În cazul nostru, cuplarea se face pe 2 fragmente recunoscute de enzima de restricţie EcoRI (a_2). Celelalte 3 enzime fie au creat capete finale netede (a_1), fie se vor uni prin punţile lui Diogen, formând noi legături ADN. Posibilităţi sunt extrem de multiple şi diverse

Scanned with OKEN Scanner

Fragmentele de restricție rezultate sunt deci formate dintr-o bandă dublă ADN dar cu capete unibandă, denumite și capete adezive (sticky ends) sau capete prelungite (care atârnă). Aceste capete prelungite, de regulă scurte ca lungime, cu ajutorul unor punți de hidrogen se pot împerechea cu capetele complementare ale unui alt segment ADN (vezi segmentul încercuit din figură indicat prin săgeată, rezultat și el ca urmare a secvenționării aceloraşi enzime de restricție precum și figura 156).

Aceste capete adezive ale unui fragment de restricție pot fi utilizate în laborator pentru realizarea unor legături extrem de diverse de proveniențe extrem de diferite. Pentru stabilizarea acestor legături se folosește o altă enzimă și anume **„ligază ADN"** care facilitează „sudarea" între cele două legături fosforice ale ambelor fragmente reunite. S-a arătat deja anterior că ligaza ADN este o enzimă cheie pentru replicarea și repararea ADN-ului.

Obținem în felul acesta ADN recombinat, fragmente de ADN, de origini diferite, reunite într-o nouă moleculă ADN care pot face de asemenea obiectul unor **produse comerciale** în funcție de valoarea lor biotehnologică. Rezultă deci că atât enzimele de restricție (nuclează de restricție) cât și ligazele reprezintă **„unelte"** extrem de importante în tehnologiile genetice. ■

1.5. VECTORII ADN-ULUI

Materialul genetic nou „fabricat" sub forma unor noi molecule de ADN care conțin genele dorite și care de obicei este păstrat în vase de reacție în laborator trebuie acum „transportat" cu ajutorul unor microorganisme în organismul țintă (bacterie, plantă, mamifere etc.). Procedeele elaborate până în prezent de cercetători folosesc ca „transportor" un **„vector de clonare"**. Cu ajutorul acestuia, noul material genetic recombinat este preluat din vasul de reacție și introdus în celulele noului organism. Vectorii în cauză sunt:

- fie plasmide bacteriene, așa cum s-a văzut în figura 154;
- fie anumite virusuri al căror comportament este asemănător unui plasmid.

Fragmentele de restricție, adică noua moleculă creată conform figurilor 155 și 156, este introdusă relativ ușor în plasmidele bacteriene și la fel de ușor plantate în bacteria vezicul. Bacteria replică, clonează plasmidul recombinat, în timp ce celulele bacteriei formează o colonie.

Anumiți bacteriofagi (virusuri) pot fi folosiți ca transportori și inductori tocmai datorită faptului că se lasă clonați (vectori de clonare) pentru anumite celule bacteriene. Fragmentele ADN-ului dorit de noi în condițiile prezenței enzimelor de restricție și a ligazelor pot fi înglobate în genomul fagilor. ADN-ul recombinat al fagilor prin procesul normal de infecție este transferat în celulele de *Escherichia coli* (fig. 157). În fagul ADN se replică și se formează noi particule fagi, fiecare din ele conținând ADN-ul străin. Acești fagi pot în continuare prin infecții să transfere ADN-ul străin altor molecule bacteriene.

Pentru practică este adesea foarte important ca ADN-ul străin, sau nou creat să nu fie clonat într-o celulă bacteriană ci în una eucariotă. Pentru aceasta biotehnicienii în

Scanned with OKEN Scanner

genetică au „fabricat" din ADN-ul ciupercilor și bacteriilor **plasmide recombinate**. Acestea pot fi implementate și se pot înmulți atât în celule bacteriene cât și în cele ale hefelor ciupercilor. Rezultă în felul acesta cromozomi artificiali în ADN-ul ciupercilor, care se poate combina cu orice ADN străin. Acest cromozom se dublează la fiecare înmulțire a celulei în mod asemănător cu cei naturali.

Virusurile vectori pot fi folosite și pentru celulele animaliere. Retrovirusurile despre care s-a vorbit într-un capitol anterior sunt foarte potrivite acestui scop. După infecție, acestea sunt înglobate în cromozomi. În felul acesta ADN-ul recombinat este inclus direct în cromozom.

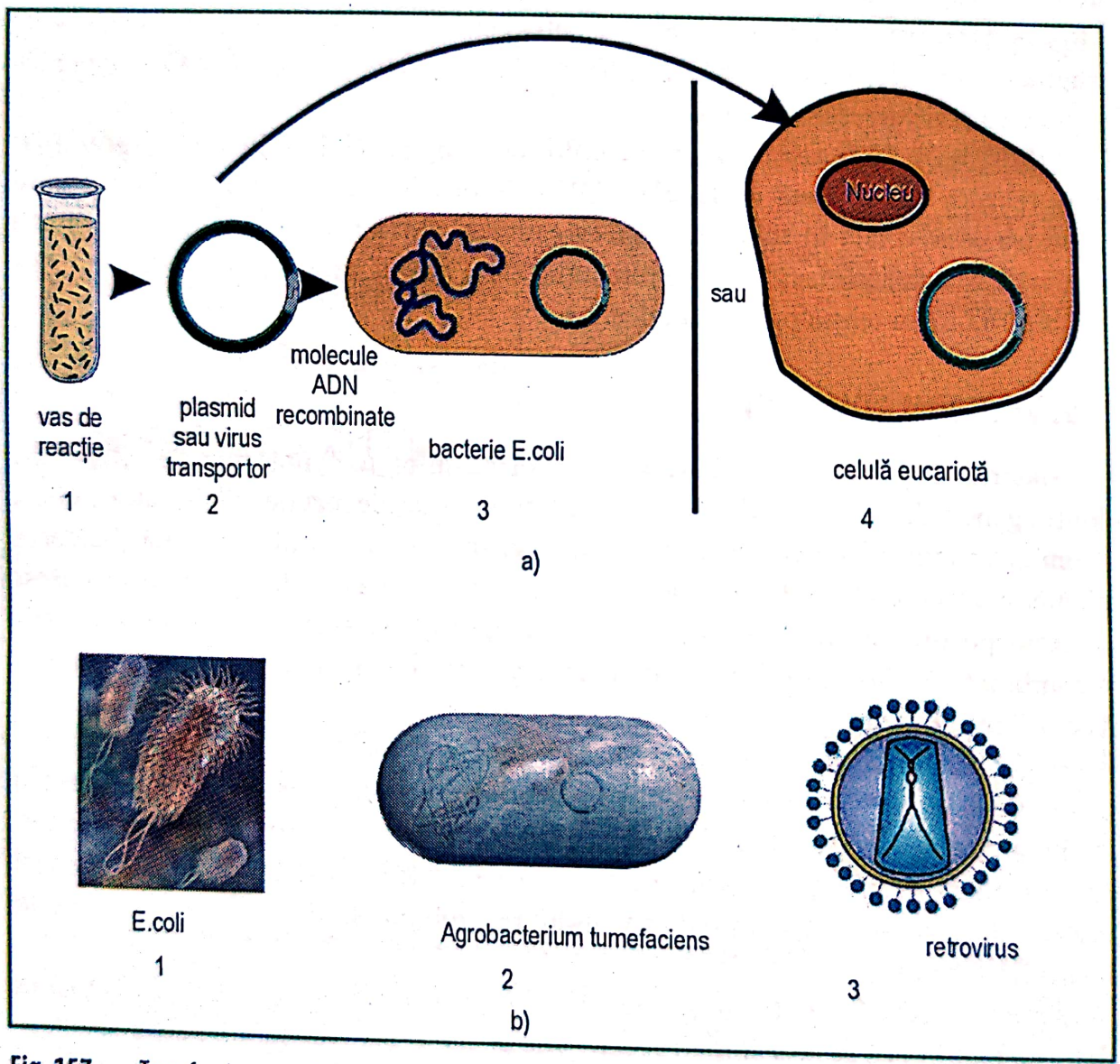


Fig. 157 – Transferul materialului genetic nou format în laborator (orig.)
1) Materialul genetic recombinat care conține și gena sau genele dorite este obținut în laborator în vasele de reacție
2) Acesta este transferat pe un vector care poate să fie un plasmid sau un virus prin metodele de acum cunoscute.
3) Vectorul este introdus în bacterie unde se înmulțește independent de cromozomii locali dezvoltând clone care pot apoi să fie transferate.
4) Vectorul poate fi indus și în celula eucariotică. Retrovirusurile sunt cele mai potrivite acestui scop

Scanned with OKEN Scanner

1.6. ORGANISMELE GAZDĂ

Acestea trebuie să îndeplinească anumite condiţii pe care cercetătorii le apreciază foarte mult şi anume:

- O izolare uşoară, simplă a ADN-ului şi recedarea acestuia altor organisme.
- Să se înmulţească repede şi să realizeze o clonare eficientă a ADN-ului de interes dorit.

Cele mai bune premize pentru îndeplinirea acestor condiţii le realizează bacteriile. Cu toate aceste avantaje prezentate de bacterii, uneori este dificilă folosirea acestora ca organisme gazdă din următoarele motive:

a) Maşinăria de translaţie şi transcripţie a eucariotelor dispune de un alt sistem enzimatic decât cel al procariotelor şi de aceea este uneori greu a dispune unei celule bacteriene să prelucreze exprimarea genetică a unei gene eucariote.
b) Numeroase proteine eucariotice sunt modificate posttranslaţional prin degradarea unor lanţuri de lipide sau de hidraţi de carbon, ceea ce celulele bacteriene nu pot realiza.

Din aceste motive, dacă suntem interesaţi în transferarea în procesul biotehnologic a unei gene eucariote şi acesta este cazul în crearea OMG-urilor la plantele şi animalele superioare sau poate chiar şi la om, atunci vom apela la o celulă eucariotă ca celulă gazdă.

După cum s-a arătat deja mai sus, celulele ciupercilor oferă numeroase avantaje printre care şi pe cel mai important, acela al implementării ADN-ului dorit în celulele plantelor şi animalelor, inclusiv în cele ale omului. Dificultatea - pentru că există şi o mare dificultate - constă în dificultatea celulelor din hefe de a prelua şi prelucra ADN-ul de interes dorit în procesul de transfer. Despre depăşirea acestor limite şi dificultăţi vom vorbi în paginile următoare. ■

1.7. TRANSFERUL GENELOR UNEI SPECII ÎN GENOMUL ALTEI SPECII (POSIBILITĂŢI TEHNICE)

S-a demonstrat deja că cele două enzime foarte necesare, practic de neînlocuit în biotehnologiile genetice, sunt **enzimele de restricţie** şi **ligasele**, două excelente instrumente de lucru care, utilizate cu inteligenţă, servesc la clonarea anumitor gene în forma unui ADN recombinat. ■

1.7.1. Clonarea genelor de către bacterii şi plasmide

Metodologia de clonare este prezentată suficient de detaliat în figura 158 (prelucrare după Neil Campbell, 2000).

Prima etapă (1) constă în izolarea a 2 molecule de ADN, de la 2 specii, şi anume:

- un plasmid bacterian sub forma de-acum a cunoscutului cerc;
- un ADN (uman în cazul nostru) care conţine gena ce trebuie clonată.

Plasmidul aparţine speciei **Escherichia coli** şi este purtătorul genei **ampR**, care imprimă acesteia rezistenţa la antibioticul ampicilină. De fapt, despre această genă

Scanned with OKEN Scanner

s-a mai scris anterior. O altă genă cunoscută şi implicată aici este **lacZ**, care codează enzima β-galactozidază, aceea care hidrolizează lactoza, un polizaharid care provine din lapte. Plasmidul deţine un singur **loc de secţionare**, unde acţionează enzima de restricţie, iar secvenţa de recunoaştere a acestuia se află în gena lacZ.

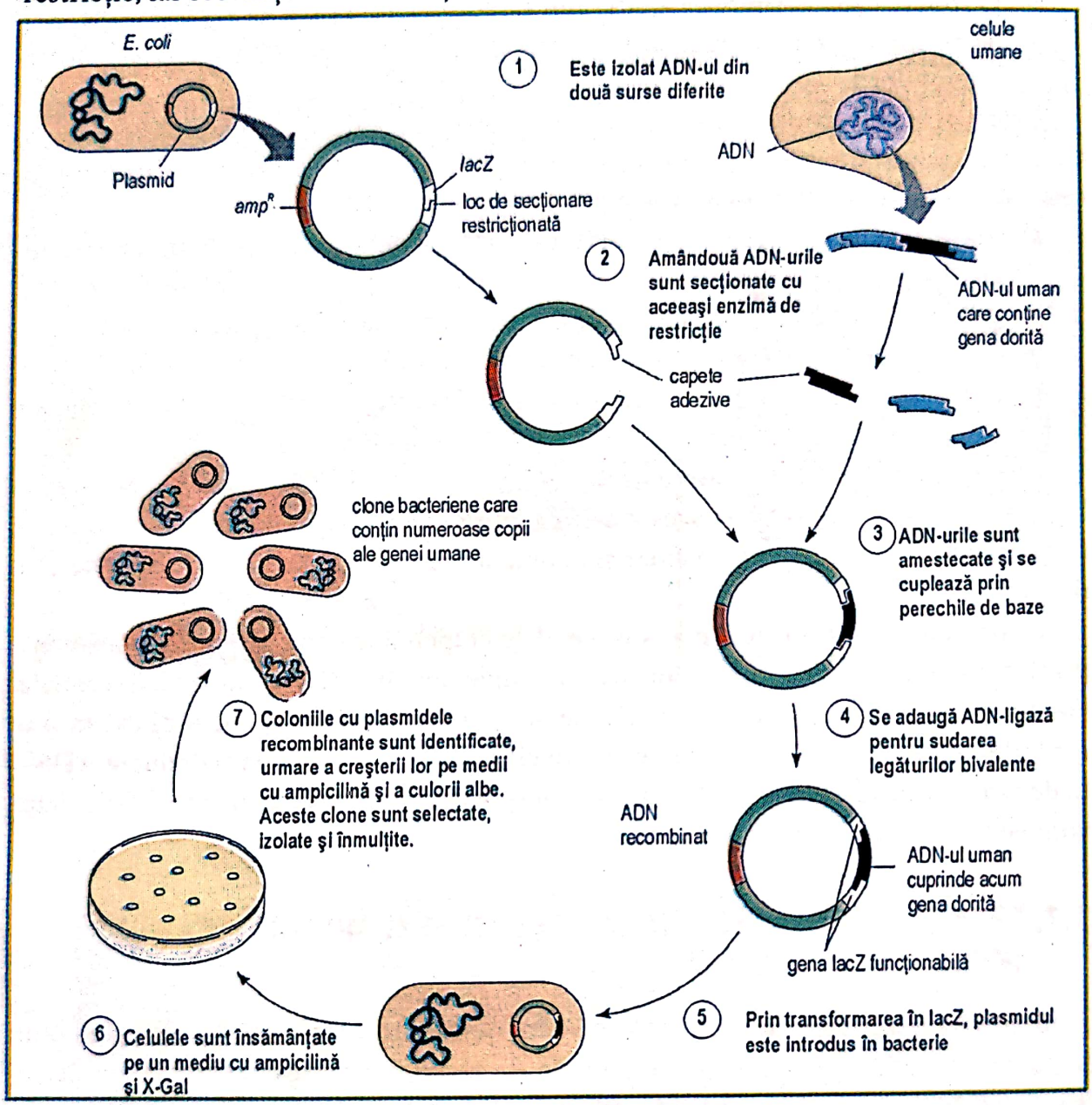


Fig. 158 – Clonarea unei gene într-un plasmid bacterian.
Reţinem că în această „lucrare" efectuată în laborator pornim de această dată cu două molecule ADN. Procesele biochimice sunt aceleaşi prezentate în capitolele anterioare (*Campbell A.N., 2000*)

Etapa a 2-a (2) Atât plasmidul cât şi ADN-ul uman sunt „digeraţi", adică secţionaţi cu aceeaşi enzimă de restricţie (de fapt secretul tehnologiei constă tocmai în a nu face cunoscută această enzimă). Enzima secţionează ADN-ul plasmidic în locul său specific de recunoaştere, denumit loc de tăiere, loc în care de fapt lacZ este întreruptă. Enzima secţionează şi ADN-ul uman în urma căreia rezultă mai multe mii de fragmente. Cu ocazia secţionării rezultă atât la fragmentul de ADN uman cât şi la plasmid acele capete adezive. Pentru simplificare în figură este prezentată includerea unui

Scanned with OKEN Scanner

fragment ADN uman într-un plasmid. În practică însă constatăm că avem de-a face cu milioane de plasmide secționate și un amestec heterogen de milioane de fragmente de ADN uman.

Etapa a 3-a (3) - Are loc amestecarea ADN-ului uman cu plasmidul bacterian secționat. Capetele adezive ale plasmidului se cuplează cu cele ale fragmentelor ADN uman sub formă de perechi de baze. Se ajunge și la alte combinații, cum ar fi perechi între plasmide sau reunirea unui plasmid cu mai multe fragmente de ADN uman.

Etapa a 4-a (4) - Enzima ligasă - ADN sudează covalent cele două categorii de fragmente. Rezultă un amestec heterogen de molecule ADN recombinate.

Etapa a 5-a (5) - Plasmidul recombinat cu ajutorul unor procese de transformație este introdus în celula bacteriană. Prin transformație se înțelege preluarea unui ADN neutru din mediu în celulă. S-a scris anterior despre acest lucru. Câteva bacterii vor prelua și integra mult doritul plasmid. Numeroase alte celule bacteriene vor prelua alte molecule de ADN recombinat din mediul de cultură cercetat.

Etapa a 6-a (6) - Celulele transformate sunt selectate pentru că ele se deosebesc de cele netransformate. Cultura bacteriană cu numeroasele ei plasmide recombinate este înmulțită. Odată cu formarea clonelor celulelor bacteriene, se multiplică, se înmulțește fiecare genă a plasmidului recombinat, adică se clonează și ele. Se diluează soluția de nutriție de așa manieră încât unei colonii îi corespunde o singură clonă. În felul acesta se ajunge la posibilitatea ca genele plasmidului să fie ușor selecționate. Se selecționează coloniile bacteriene cu plasmide recombinate în care celulele au devenit rezistente la ampicilină - deoarece ele sunt purtătoarele genei care le imprimă rezistență la acest antibiotic (amp^R). Celulele selecționate sunt acum aduse pe un mediu bogat în ampicilină. Aici se vor putea înmulți numai acele celule care au preluat plasmidul cu gena amp^R. Ele vor forma colonii. Celelalte celule vor muri. Mediul de cultură conține de asemenea o polizaharidă modificată denumită X-Gal. X-gal poate fi separată cu ajutorul β-glucosidazei cu care ocazie rezultă un **punct albastru.**

Etapa a 7-a (7) - Colonia bacteriană care deține plasmidul purtător al genei de interes se prezintă colorată în alb. Culoarea apare pentru că β-glucosidaza este întreruptă și nu se mai poate produce nici o enzimă. Celulele bacteriene fără plasmid pozitiv (purtător al genei utile) se colorează în albastru deoarece ele dețin o genă intactă a β-glucosidazei care face posibilă producerea acestei enzime. Celulele dorite vor produce însă colonii albe pe un mediu cu ampicilină și **X-gal**. Rezultatul final al evoluției în etape de la 1 la 7 al acestui procedeu biotehnologic constă deci în identificarea unei colonii care să conțină un plasmid recombinat sau un fragment ADN, ce conține gena dorită. **De fapt, aceste fragmente ADN se diferențiază de la o clonă la alta și necesită suficientă muncă și numeroase tehnici de finețe până la găsirea genei reale dorite.** ■

Scanned with OKEN Scanner

1.7.2. Obținerea genelor necesare clonării

Se pune întrebarea: de unde își procură cercetătorii genele potrivite, în momentul potrivit, să spunem atunci când primesc o comandă din partea unei mari companii, pentru fabricarea unui OMG, fie el bacterie, plantă sau animal?

Pentru aceasta există 2 surse principale:

1) Direct din organismele ale căror însușiri genetice sunt bine cunoscute, adică au un genom complet identificat, descifrat. În acest caz se izolează fragmente din ADN-ul principal sau complementar care se prelucrează apoi în laborator, după procedeul mARN. Totodată se presupune că sunt bine cunoscute în organismele studiate genele ale căror însușiri se vor transferate (acest lucru nu se poate face decât cu gene cu tot).
2) Prin utilizarea băncilor de date, a bibliotecii genomice (genomic library) specifice bioinformaticii, așa cum s-a văzut deja în capitolul anterior. După procedeul prezentat în figura 159, urmare a clonării genelor umane și animale, rezultă milioane de ADN-uri recombinate care conțin gene ce nu sunt utile pentru scopul „x", dar pot fi utile pentru scopul „y" sau „z" etc. Acestea se găsesc în amestecuri formate din fragmente aparținând întregului genom al organismului din care s-au recoltat genele dorite. Acest mod de clonare este cunoscut în engleză ca metoda de „shoot gun", iar în germană „Schratschusse", ceea ce înseamnă „metoda puștii de vânătoare" - unde se trage cu alice prin asemănare cu un cartuș cu alice, adică o baie cu milioane de fragmente ADN clonate, din care oricând se poate alege o nouă genă folositoare.

Dacă în locul plasmidelor bacteriene vectorii folosiți sunt fagii (virusuri) bacterieni care, după cum am văzut, se aseamănă mult cu plasmidele, rezultatul clonării genelor va fi de asemenea o bibliotecă dar sub formă de particule fagi în care ADN-ul recombinat va conține alte fragmente ale genomului.

Pentru clonarea ADN-ului provenit de la celulele eucariote problema se complică deoarece ADN-ul acestora conține adesea regiuni întinse care nu codează denumite **introni** (s-a vorbit anterior despre ei). Or, bacteriile nu sunt în măsură să inducă exprimarea unor asemenea gene. Pentru rezolvarea acestei probleme, cercetătorii au „fabricat" și pun la dispoziție „gene artificiale" fără introni (fără material genetic inactiv). Materialul „de pornire" este mARN-ul disponibil în permanență în celule. Procesul biotehnologic elaborat pentru obținerea acestui procedeu denumit „procedeul fabricării ADN-ului complementar (cADN) la genele eucariote. Este desenat în figura 160 care prezintă schematic, în două faze, derularea acestuia. Faza I este prezentată în două etape:

Faza I (1) presupune derularea transcripției unei gene care conține introni în nucleul celulei. Prima etapă a transcripției conduce la formarea pre-mARN-ului.

(2) Spleisozomii înlătură intronii și cuplează exonii la mARN în urma acestor reacții rezultând o moleculă adultă de mARN.

Faza a II-a (3) cercetătorul izolează mARN-ul din celule și îl utilizează ca model, ca matriță pentru sinteza unei benzi de ADN complementar (cADN).

Scanned with OKEN Scanner

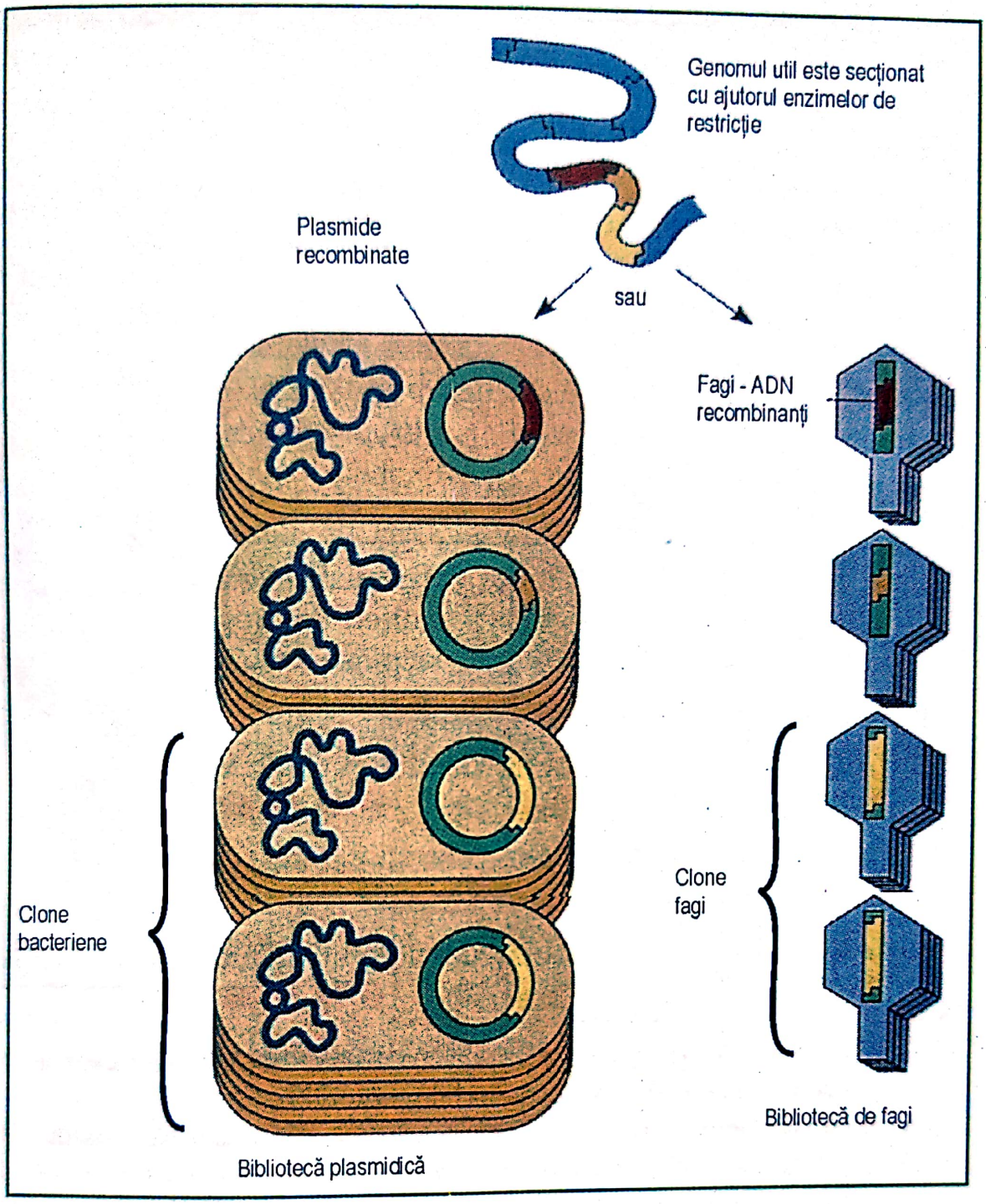


Fig. 159 – Diferite biblioteci genomice.
O bibliotecă genomică se definește ca o colecție de diferite clone bacteriene sau virale (fagi) cu condiția ca fiecare bacterie sau fag să dețină un fragment ADN al unui genom străin. Într-o bibliotecă completă se află practic însumate toate fragmentele genomului organismului de la care se recoltează genele clonate.
Pe partea stângă a desenului se află doar 4 din miile sau poate milioanele de „cărți" ale unei biblioteci plasmidice. Fiecare „carte" reprezintă o clonă bacteriană care deține informația proceselor de clonare ale unui plasmid recombinat ce deține un segment ADN special (colorate diferit). În partea dreaptă se găsesc aceleași fragmente genomice în 4 standuri de cărți care constituie o bibliotecă de fagi
(prelucrare după Campbell A.N., 2000 și Lodish, 2001)

Scanned with OKEN Scanner

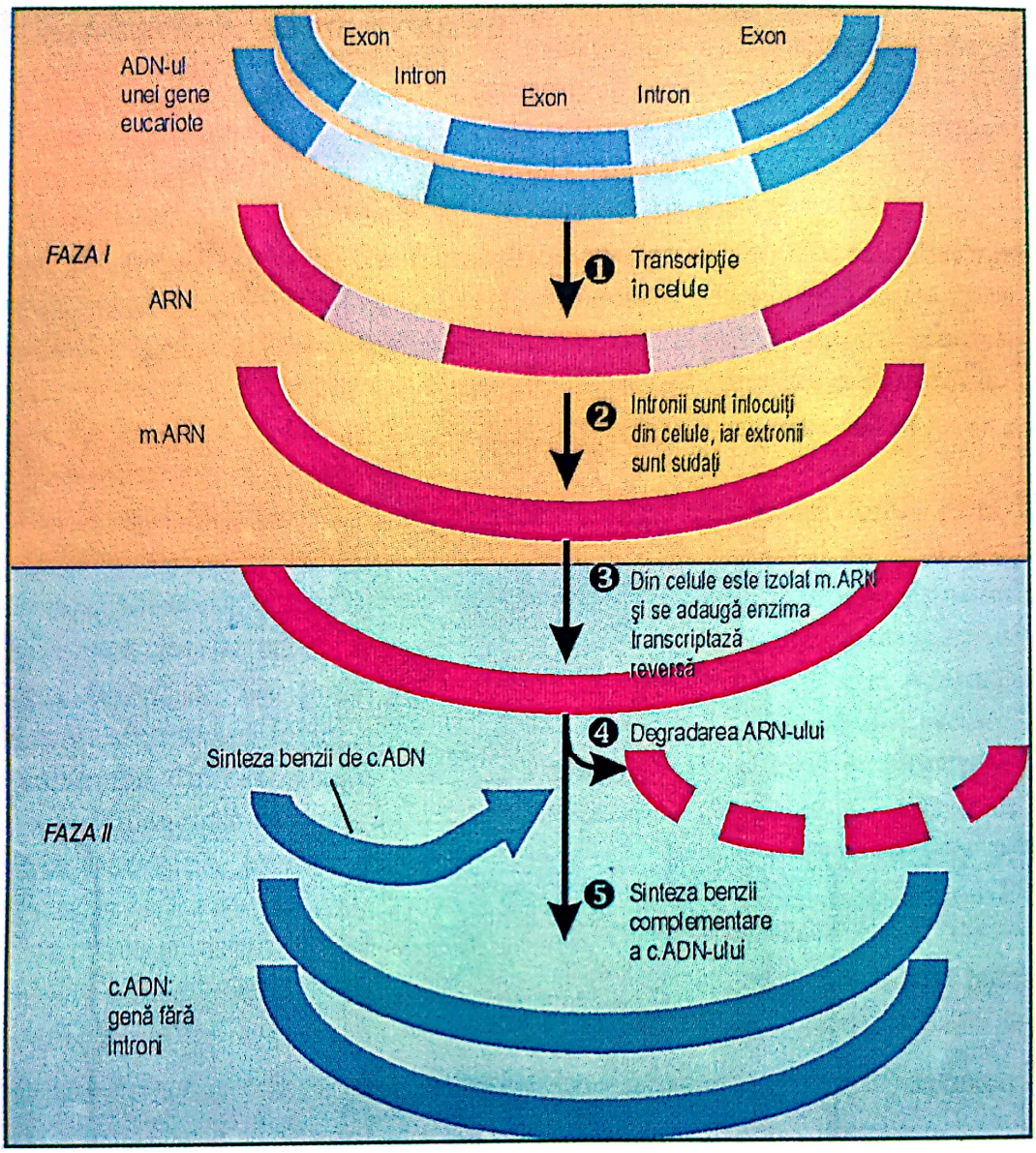


Fig. 160 – Fabricarea ADN-ului complementar (cADN) pentru o genă eucariotă (*original*).

Prin definiție ADN-ul complementar este acea formă de ADN care se fabrică în laborator cu ajutorul enzimelor transcriptază reversă aplicată unui mARN ca matriță.

cADN-ul nu conține nici un intron și ca urmare este mai mică decât gena inițială și de aceea se lasă mult mai ușor clonată. cADN-ul se lasă ușor exprimat de către bacteriile specializate care n-ar fi dispus de mașinăria îndepărtării intronilor în procesul transcripției ARN-ului.

Pentru a fi transcris cADN-ul trebuie să fie clonat pe o locație în spatele unui promotor bacterian specific (care i se potrivește) deoarece el (cADN-ul), spre deosebire de gena din care provine nu dispune de un promotor al său.

Sinteza unui ADN pe o matrice ARN are loc în sensul invers transcripției. Reacția este catalizată de către o enzimă care a fost izolată dintr-un retrovirus (vezi capitolele anterioare).

(4) O dată cu sinteza primei benzi cADN, ARN-ul este descompus.

(5) Enzima polimerază-ADN sintetizează acum după prima bandă matrice cADN pe cea de-a 2-a, complementară. Apare în felul acesta un ADN complet, adică o moleculă de ADN care deține o versiune a genei fără introni și care a fost denumită ADN-COMPLEMENTAR sau cADN

Scanned with OKEN Scanner

Fabricat în felul acesta, cADN-ul poate fi introdus într-un vector bacterie şi poate acolo fi **transcris şi translatat**, chiar dacă bacteria nu dispune de instrumentul - sudură - ARN specific spleisozomilor care lipsesc la bacterie. ADN-ul introdus în celula vector nu dispune însă de un control al secvenţelor care să inducă transcripţia şi translaţia. Acesta, adică semnalul necesar, trebuie să provină de la ADN-ul vectorului.

Deoarece molecula de mARN cuprinsă în gena care trebuie clonată şi apoi identificată după procedeele mai sus prezentate nu poate fi separată de restul mARN-ului din celulă, metoda sintezei cADN-ului ca şi metoda „shoot-gun" conduce la rândul ei la formarea unei biblioteci genomice intitulată de această dată bibliotecă cADN care cuprinde o importantă rezervă de cADN clonat ce poate fi folosit pentru clonarea şi identificarea altor gene eucariotice.

Cu toate acestea, trebuie să subliniem faptul că această bancă de date cuprinde numai o parte din informaţia genetică a organismului care se studiază, şi anume numai acele secvenţe nucleotidice care s-au găsit în celulele prezervate şi trecute pe mediul de cultură.

În biblioteca cADN se vor exprima genele întâlnite numai în acestea. Pentru cercetător acest lucru este extrem de important pentru că el poate studia expresia genelor într-un anumit tip de celule sau într-o anumită fază de dezvoltare.

Premiza unui succes real biotehnologic constă în izolarea acelei celule din organismul studiat care conţine, să zicem, gena cea mai căutată pentru că este cea mai performantă. Or, acest lucru este mult mai uşor de zis, de presupus decât de realizat în practică. ■

1.7.3. Introducerea ADN-ului în celule

Se cunosc deja o sumedenie de metode destinate introducerii ADN-ului în celule. Această abundenţă de tehnici, de metode este rezultanta unor combinaţii între numărul şi felul vectorilor şi numărul şi felul celulelor gazdă. Cea mai utilizată metodă gentehnologică o constituie „absorbţia ADN-ului din soluţia mediu de cultură".

Spre exemplu, dacă vectorul ADN este un fag, un virus bacteriofag, atunci ADN-ul este împachetat în membrana proteică a acestuia, urmând ca ulterior celula gazdă să fie infectată. Chiar dacă celulele gazdă sunt alcătuite din hefele ciupercilor, absorbţia rămâne principala cale prin care plasmidele recombinate pot fi transformate.

În anumite condiţii celulele eucariote ale hefelor ciupercilor pot prelua chiar şi segmente liniare de ADN pe care apoi le înglobează urgent în genom. Există şi alte celule eucariote care pot să „transforme" fragmente de ADN.

Există însă şi o serie întreagă de **tehnici agresive** pentru **introducerea ADN-ului în celulele eucariote.**

(1) Una dintre acestea este cunoscută sub denumirea de **electroporaţie**. Metoda constă în a provoca un scurt impuls electric în soluţia cu celule în suspensie, cu scopul de a provoca anumite orificii în membranele plasmatice prin care ADN-ul poate să pătrundă. Aceste orificii pot apoi să se reînchidă.

Scanned with OKEN Scanner

(2) A 2-a metodă constă în utilizarea unui ac microscopic de mare finețe care să permită injectarea ADN-ului în celule. Metoda se numește prin **microinjectare.**

(3) A 3-a metodă tehnică de introducere a ADN-ului în celulele eucariotelor este utilizată la plante și constă în „împușcarea" cu ajutorul unui „pistol special" a acestui ADN care înconjoară o bilă metalică microscopică direct în celule (fig. 161).

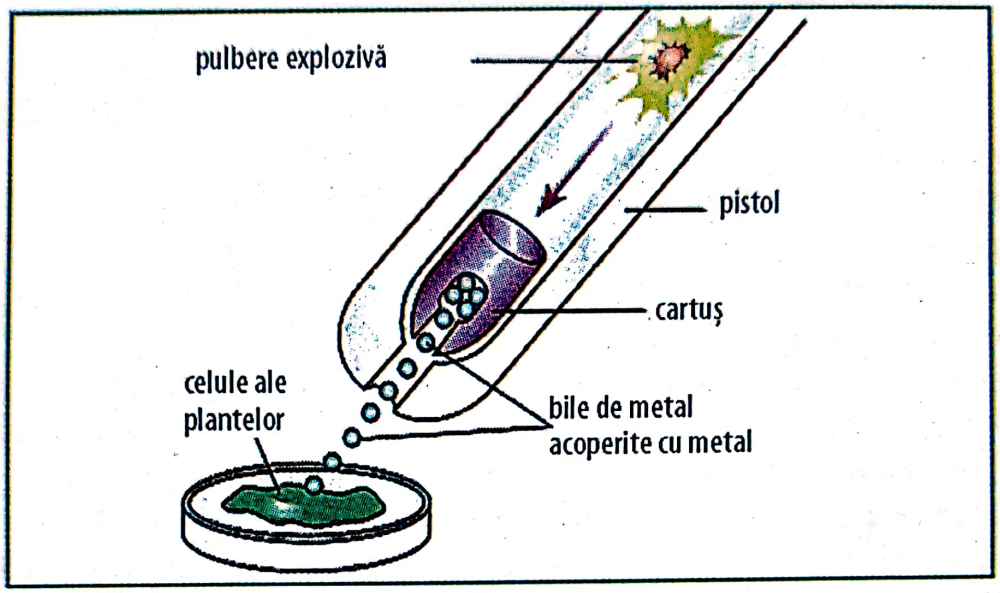


Fig. 161 – Un pistol cu gloanțe ADN.
Pistolul este o armă de calibru 22. Cu ajutorul ei, bilele metalice pe suprafața cărora se află o pieliță din cultura de ADN recombinat. Arma poate fi cu praf exploziv sau cu aer comprimat. Tras asupra plantei, cartușul se va opri în apropiere de vasele capilare însă bilele vor zbura în continuare spre celule. Proiectilele vor penetra peretele celular și membranele și în felul acesta ADN-ul recombinat va ajunge în nucleul celulei. Procedeul poate fi utilizat și pentru obținerea clonelor vegetative

Toate aceste metode sunt utilizate pentru ca ADN-ul recombinat să ajungă și să fie înglobat în celula gazdă. ■

1.7.4. Identificarea prin selecție a genei de interes

Încercăm în acest subcapitol să demonstrăm experimental, așa cum au făcut-o cercetători de prestigiu, modul în care poate fi depistată gena dorită dintre multe mii de clone din biblioteca cADN sau din milioane de fragmente ADN ale unei biblioteci genomice imense.

Există și pentru această identificare mai multe metode:

a) Metoda screening

Se cunoaște deja din capitolele anterioare că fiecare clonă a unei anumite gene „exprimă" o proteină bine definită. În acest caz gena de interes poate fi găsită printr-un screening pentru această proteină. Dovada existenței acestei proteine se află în depistarea activității ei, în cazul enzimelor sau se poate recunoaște cu un anticorp specific la structura sa.

Scanned with OKEN Scanner

În ambele locații experimentale proteina trebuie să fie fabricată neapărat într-o celulă transformată, ceea ce nu se întâmplă întotdeauna. Din aceste motive, metoda screening nu aduce dovada produsului - genă (adică obținerea proteinei codată de gena căutată) ci mai degrabă dovada existenței secvenței nucleotide, ceea ce este cu totul altceva.

Tot din aceste motive, metodele destinate demonstrării existenței unei gene căutate, respectiv a unui cADN se bazează în întregime pe perechile de baze formate dintr-un polinucleotid și partenerul său complementar.

b) Metoda hibridizării

Reprezintă un procedeu deja mai sus amintit. În acest caz molecula complementară poate proveni fie din materialul ARN, fie din ADN și este denumită SONDĂ (în engleză probe).

Dacă se cunoaște cel puțin o parte a secvenței nucleotide a ADN-ului căutat (de interes) sau dacă poate proveni din secvențele de aminoacizi ale produselor proteice (condiționat altminteri de redundanța codurilor genetice), atunci sonda ADN poate fi sintetizată chimic. Sonda poate fi cuplată de ADN-ul de interes cu ajutorul unor punți de hidrogen pe locurile specifice acestei legături.

Sonda poate însă în procesul de sinteză să fie marcată cu un izotop radioactiv, fie cu o substanță fluorescentă - colorată.

În figura 162 se arată mai multe clone bacteriene, aduse pe un mediu de cultură solid pentru a fi clonate în foarte numeroasele exemplare. Acestea pot apoi să fie cercetate cu ajutorul unei sonde specifice care poate să pună în evidență prezența secvenței de ADN complementar. Sonda radioactivă detectează clona bacteriană căutată.

Am spune noi că în felul acesta este găsit acul în carul cu fân. Acest lucru a fost posibil tocmai datorită faptului că sonda (o secvență de ADN sau ARN) s-a cuplat prin acele punți de hidrogen exact de ADN-ul complementar care a avut libere aceste locuri de cuplare, realizându-se un **hibrid între sondă și ADN-ul căutat (de interes).**

O dată identificată clona dorită se trece apoi la realizarea unei culturi suficient de elaborate, cantitativ și calitativ în așa fel încât gena să poată fi cercetată în detaliu. O genă valoroasă o dată identificată poate fi ea însăși folosită ca sondă pentru a putea „pescui" gene identice din alte biblioteci genomice sau cADN. ■

1.7.5. Exprimarea genei clonate

Este deja cunoscut că după identificare, practic gena căutată nu se poate exprima în mediul nou în care a fost găsită. În afara universalității sale, adică a faptului că există pretutindeni în lumea vie, codurile genetice care sunt pe de-a-ntregul principalii factori ai transcripției și translației la pro și eucariote sunt totodată diferite. Devine iarăși necesară crearea unei molecule de ADN recombinat pentru a se induce semnalele reale necesare transcripției și translației în celula gazdă, și anume:

a) Se utilizează în acest sens introducerea secvențelor - semnal direct în vectorul de clonare.

Scanned with OKEN Scanner

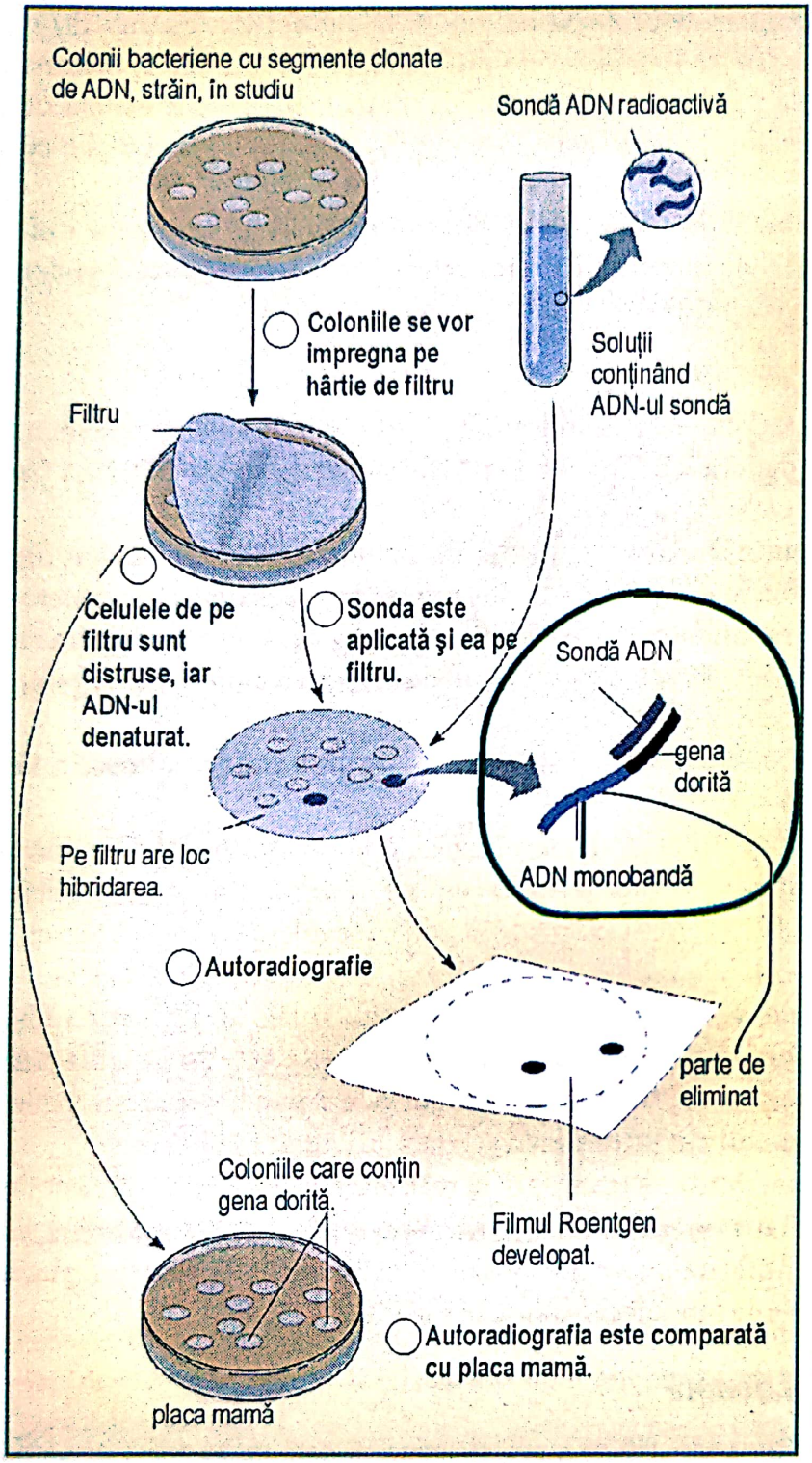


Fig. 162 – Identificarea unei gene clonate, dorite, cu ajutorul unei sonde ADN sau ARN.
Baza tehnică a acestei metode constă în:
– secvența nucleotidică complementară a perechilor de baze;
– punțile de hidrogen;
– legătura dintre punte și secvențe prin intermediul bazelor.
În desen, ca material de lucru sunt folosite următoarele:
♦ genă clonată înglobată printr-un plasmid bacterian;
♦ o sondă formată dintr-un mic segment de ADN artificial, complementar cu o secvență, cu un segment de genă clonă.
Etapele:
(1) Coloniile bacteriene sunt „ștampilate", adică aplicate pe o hârtie de filtru.
(2) Hârtia de filtru este astfel tratată încât celulele să fie distruse și ADN-ul denaturat. Fragmentele de ADN monobandă rămân legate de filtru.
(3) Sonda ADN marcată radioactiv pregătită sub formă de soluție este aplicată pe hârtia de filtru. ADN-ul hibridează (formează perechi de baze) fiecare cu ADN-ul său complementar pe hârtia de filtru. Surplusul de ADN este spălat.
(4) Filtrul se așază pe un film röntgen iar în locul unde sonda este legată, cuplată, filmul se înnegrește (în figură se observă 2 pete negre).
(5) Autoradiografia se compară cu placa mamă pentru a se constata în care colonie se află gena de interes

b) Se aleg enzimele de restricție cele mai potrivite, care să secționeze exact în poziția strategică a plasmidului sau altui vector.

c) ADN-ul de interes este plasat direct după (în spatele) promotorului sau a altor secvențe semnal ale celulei gazdă. Celula gazdă recunoaște molecula de ADN recombinat ca pe o genă „legitimă" și se va implica în transcrierea și translatarea ei.

Scanned with OKEN Scanner

În zilele acestui început de mileniu, cercetătorii au descoperit și pregătit vectori cu o mare acoperire, bine dezvoltați, care permit „exprimarea" a foarte numeroase proteine eucariote în bacterii.

d) Pentru îmbunătățirea și eventual optimizarea capacității de expresie a genelor clonate pot fi folosite și alte metode, cum ar fi:
   1) Plasarea moleculei clonate de ADN pe o genă bacteriană care este cunoscută ca având o mare capacitate de exprimare.
   2) Perfecționarea genetică prin mărirea capacității de exprimare a celulei gazdă în sensul că proteinele clonate, după sondare pot fi analizate și reținute numai acelea dintre ele care sunt utile. În felul acesta materialul genetic care se transferă este purificat, exprimarea devine mai clară, iar eventualele efecte negative ale materialului genetic suplimentar (poluant) pot fi eliminate (fig. 162). Așa cum se va vedea, OMG-urile din generația a 2-a produse recent de cercetătorii francezi țin cont de acest lucru. ■

Scanned with OKEN Scanner

2. NOI POSIBILITĂȚI PENTRU TEHNOLOGIILE GENETICE

Necesitatea de a produce o cantitate cât mai mare de material genetic care apoi să fie supus proceselor de recombinare mai sus prezentate i-a pus pe cercetători în situația de a căuta diverse metode pentru a crea și a obține secvențe ADN cât mai numeroase. Se pare că fizica modernă vine în sprijinul biotehnologiilor, ultimile realizări în acest sens fiind edificatoare. ■

2.1. ELECTROFOREZĂ - GEL

Metoda constă în separarea și evidențierea fragmentelor ADN obținute ca urmare a „digestiei" cu enzime de restricție. Folosind electroforeza, macromoleculele sunt separate în funcție de mărime, de sarcina lor electrică și în funcție de alți parametri fizici, indiferent dacă acestea sunt alcătuite din acizi nucleici sau proteine.

Utilizarea acestei tehnici constă în identificarea anumitor molecule ADN, folosind eșantioane de suspensii obținute în laborator, urmare a secționării unor ADN-uri complexe cu ajutorul enzimelor de restricție.

Este foarte cunoscut faptul că această metodă este frecvent utilizată în virusologie pentru identificarea ADN-ului viral. Mai puțin cunoscut este faptul că ea poate fi folosită la fel de bine și pentru obținerea ADN-ului plasmidic ca și pentru identificarea și separarea anumitor segmente ale ADN-ului cromozomal. Electroforeza în gel poate fi folosită cu mare succes și la purificarea după identificare, a fragmentelor de ADN, căutate și dorite. După stabilizarea și menținerea activităților biologice de bază, acestea pot fi extrase și izolate din gel. Pe lângă cele prezentate în acest subpunct există încă numeroase alte exemple de utilizare a acestei metode, pe care le vom prezenta mai târziu.

O prezentare mai de detaliu a metodei este prezentată în anexa 15. ■

2.2. METODE PRIVIND SECVENȚIONAREA* ADN

Deoarece au apărut anumite discuții pe această temă, este bine de precizat că secvenționarea nu este identică nu secționarea. Secvenționarea reprezintă o secționare a unui segment „măsurat, determinat" a unui fragment ADN. De regulă, secvenționarea se referă la tăierea ADN-ului în „porțiuni de nucleotizi" calculate apriori pentru un anumit scop necesar recombinărilor. Tehnica de astăzi face posibil ca secvența nucleotidică a unei gene să poată fi determinată în numai câteva zile, cu condiția ca clona ADN izolată să fie disponibilă. Altminteri, fabricarea acesteia, adică a clonei, putând să dureze luni sau ani de zile.

Cea mai utilizată tehnică este secvenționarea ADN după metoda SANGER (vezi anexa 16). Metoda constă în legătura dintre substanțele chimice specifice bazelor sau a reacțiilor enzimatice cu gel - electroforeză de înaltă diluție. Prin această metodă se

* Prin secvenționare trebuie să înțelegem în această lucrare secționarea ADN-ului în secvențe nucleotide la anumite intervale recunoscute de enzima de restricție.

Scanned with OKEN Scanner

pot afla extrem de numeroase informații, deținute de secvența unei gene sau a unui alt segment ADN. Analiza secvențelor nucleotidice a unui asemenea ADN se constituie în cea mai rapidă metodă de determinare a secvențelor de aminoacizi codați de către proteinele lor. Pe de altă parte, se pun la dispoziție secvențe lămuritoare asupra poziției locurilor de secționare restricționată (adică locul unde taie enzimele de restricție) prin care pot fi experimentate alte tehnologii genetice. De regulă, noile secvențe ADN descoperite și descrise sunt înmagazinate în computerul internațional ce cuprinde banca de date și despre care am vorbit în subcapitolul „Bioinformatica".

În banca de date se acumulează numeroase informații extrem de utile privind înțelegerea genelor și a factorilor (elementelor) lor de control, dar tot din banca de date. Cercetătorii autorizați pot extrage segmente ADN mai lungi sau mai scurte cum ar fi promotorii sau enhancerii, necesari unor noi construcții genetice. Totodată, compararea genelor de diferite proveniențe conduce la clasificarea organismelor și la descoperirea apropierii lor evoluționare. ■

2.3. AMPLIFICAREA, ÎNMULȚIREA ADN-ULUI DE INTERES, UTIL

Pentru înmulțirea ADN-ului util biotehnologic, atât de căutat uneori, este bine cunoscută metoda „**reacției în lanț a polimerazei**" (PCR care vine din formularea în engleză „Polymerase Chain Reaction").

Tehnica prezentată în anexa 17 permite înmulțirea rapidă a segmentelor dorite de ADN in vitro, adică în afara organismului. Ea devine astfel o alternativă extrem de valoroasă a clonării. În anumite condiții impuse prin mediul de cultură, ADN-ul împreună cu primerii (și ei segmente scurte de ADN), cărora li se adaugă enzima „polimerază ADN" se supun unui proces de incubare în laborator. În decursul a câteva ore apar în mediul de cultură miliarde de copii ale unuia sau altuia din fragmentele ADN.

În tehnologia clasică descrisă mai sus, aceea a recombinării și replicării într-o celulă gazdă, au fost necesare mai multe săptămâni pentru obținerea aceleiași cantități de material genetic, nou, de interes. Această tehnologie a fost pusă la punct printr-o colaborare între mai mulți cercetători în biologie moleculară începând cu anul 1895 și a revoluționat cu adevărat tehnicile genetice, fiind și astăzi frecvent comercializată, deși între timp au mai apărut și alte variante și metode mai performante.

În această tehnologie, impresionantă este în primul rând viteza de reacție, dată de specificitatea P.C.R. Primerul (despre care s-a vorbit într-un capitol anterior) determină, impune care secvență ADN trebuie amplificată, înmulțită. Din aceste motive, segmentul ADN dorit nu trebuie izolat din materialul de plecare (materialul în care a fost identificat) înaintea declanșării reacției PCR. Această constatare aduce o serie de avantaje, atunci când tehnica PCR este combinată cu alte strategii de combinare, lucru frecvent întâlnit în practică.

S-a enunțat deja faptul că lucrul cel mai dificil în aceste tehnici de clonare îl constituie identificarea și izolarea din milioanele de diverse clone existente în „amestec" a celor potrivite, adică a acelora de care avem nevoie pentru continuarea procesului biotehnologic. Este deci de mare importanță înmulțirea ADN-ului de interes cu PCR, înainte de clonarea

Scanned with OKEN Scanner

acestuia. Numai în felul acesta în amestecul obţinut se află o mare populaţie a ADN-ului din care prin selecţia finală pot fi obţinute cu uşurinţă clonele pozitive.

Tehnica PCR oferă în egală măsură şi un alt avantaj şi anume acela că ADN-ul dorit nu trebuie purificat înaintea înmulţirii sale, ceea ce face ca materialul obţinut să fie comercial mult mai accesibil. Totodată, în materialul de pornire, cantitatea de ADN clonabil este suficientă chiar dacă este prezent în cantităţi extrem de mici. Tehnica PCR permite degradarea şi selecţia impurităţilor genetice în aşa fel încât ceea ce trebuie înmulţit să fie o biomoleculă deosebit de stabilă. Asemenea biomolecule stabile prezente chiar şi în organisme fosilizate, tocmai din cauza stabilităţii lor ar putea fi amplificate din aceste mostre, chiar după mii sau milioane de ani. Este lesne de înţeles ce consecinţe şi ce perspective deschide această tehnologie.

Printre realizările obţinute pe această cale amintim doar câteva:

- înmulţirea ADN-ului străvechi, obţinut prin recoltare dintr-un mamut congelat acum 40.000 de ani;
- înmulţirea unor fragmente micro, de sânge, ţesuturi sau spermă, aflate la locul crimelor, metoda contribuind la identificarea rapidă a criminalilor;
- înmulţirea fragmentelor de ADN dintr-o singură celulă embrionară pentru diagnosticarea rapidă a bolilor cu transmitere ereditară;
- înmulţirea ADN-ului viral, a genelor, a unor virusuri greu de depistat, HIV, virusul SIDA, şi multe altele. ■

2.4. HIBRIZI GENETICI SAU HIBRIDIZARE

Am explicat deja un anumit fel de hibridare (hibridizare) în contextul utilizării „sondelor" pentru identificarea clonelor specifice. Această tehnică s-a dovedit însă a fi utilă pentru rezolvarea unui număr extrem de mare de probleme din acest domeniu, cum ar fi:

- După identificarea unei gene care joacă un rol important în regularizarea mitozei ciclului celular al hefelor ciupercii, se pune întrebarea dacă această genă, aşa cum spuneam extrem de utilă, nu ar putea fi întâlnită la om, mamifere sau plante. Răspunsul poate fi găsit numai în tehnica hibridării, prin care sonda marcată (adică un fragment ADN definit) este complementară ADN-ului pe care vrem să-l depistăm la alte organisme. Dacă hibridarea reuşeşte, adică sonda se leagă prin perechile sale de bază la ADN-ul străin, atunci acesta este cel căutat şi el poate fi recunoscut prin marcajul radioactiv al sondei (vezi fig. 162). Prin această hibridare sau hibridizare, cum îi spun unii cercetători, aceştia pot să afle mult mai multe informaţii despre secvenţele înrudite, decât prezenţa sau neprezenţa lor în soluţia reactivă. Pentru aceasta a fost dezvoltată o nouă metodă de hibridare denumită în engleză Southern-Blotting de la autorul ei E.M. Southern, care a pulicat-o în 1975 şi preluată ca atare şi în alte limbi (Southern fiind un simbol de recunoaştere, iar Blotting reprezentând hârtie filtru sugativă). Detaliile sunt prezentate în anexa 18 unde este prezentată pe larg metoda. Aceeaşi metodă mai este denumită de alţi cercetători ca Southern-hybridization (hibridare după metoda Southern). Metoda are avantajul că, pe lângă recunoaşterea

Scanned with OKEN Scanner

existenței ADN-ului de interes ne pune la dispoziție și cantitatea disponibilă a ADN-ului căutat precum și mărimea secvenței nucleotidice care caracterizează ADN-ul sau gena dorită.

Prin aceeași metodă, a hibridării sau hibridizării poate fi studiat de asemenea și mARN-ul.Această metodă analogă a fost denumită „Northern-hybridization" sau „Northern-Blotting". Multe informații pot fi obținute și cu această metodologie dar cea mai importantă constă în a stabili dacă o anumită genă prezentă în mARN este transcriptibilă, cât din acest mARN poate fi format prin transcripție și dacă cantitatea și stadiul de dezvoltare sau anumite semnale regulatorii țin de această genă.

Northern-Hybridization (hibridare nordică) a devenit ceva mai târziu o importantă tehnică de cercetare a controlului expresiei genelor. În fine, există și o metodă denumită Western-Blotting, dar care are mai puțin incidență cu biotehnologiile genetice și una mai mare cu reacția anticorpilor cu proteinele separate prin electroforeză. ■

2.5. ANALIZA RIFLIPS SAU RFLP

S-a prezentat deja faptul că fragmentele ADN produse în procesul digestiei cu o anumită enzimă de restricție o dată separată prin gelectroforeză formează o bandă specifică (vezi anexa). Fiecare bandă corespunde unui fragment ADN, restricționat de o anumită lungime. Tehnica a fost folosită pentru analiza segmentelor ADN omoloage, care poartă alele diferite ale unei gene. Cercetătorii au demonstrat că ADN-ul acestor alele conduce în gelectroforeză la mostre diferite ale fragmentelor de restricție. Rezultatul în sine nu a constituit deloc o surpriză, pentru simplul motiv că diferența (de mărime) în secvențele nucleotide conduc logic la diferențe așteptate ale pozițiilor de secționare restricțională. Figura 163 demonstrează acest lucru. În desen sunt prezentate cele două alele ale aceleiași gene, care se deosebesc între ele numai printr-o pereche de baze (înrămate în negru) (C - G, respectiv A - T) (poziția a). Ca urmare a acestei diferențieri, alela 1 deține în plus o poziție de secționare restricțională prin comparație cu alela 2 (3 în loc de două) (poziția b). Ca urmare, după secționare vor apărea trei fragmente de restricție în loc de două, iar în gelectroforeză acest lucru se va manifesta prin mostre de benzi diferite pentru ADN-ul ambelor alele.

Faptul în sine a creat o anumită confuzie în lumea cercetătorilor, surprinzându-i pe aceștia, care nu se așteptau ca în procesul exprimării ADN-ul care nu codează, nu se exprimă, să conducă la aceleași rezultate ca cel care deține, exprimă și transmite informația. În realitate, s-a observat de fapt că între indivizii aceleiași specii există mai multe diferențe în benzile mostre (în benzile de reprezentare) decât ar fi fost de așteptat. Adâncindu-se cercetările s-a ajuns la concluzia că diferențe individuale în secvența ADN a cromozomilor omologi care conduc la modificări surprinzătoare ale mostrelor fragmentelor de restricții sunt de fapt foarte numeroase în genomul eucariotelor. Situația este valabilă și în cazul omului. Din cadrul aceluiași genom pot rezulta fragmente de restricție la diferite persoane, a căror lungime este diferită. Acest FENOMEN a fost definit ca **polimorfism privind lungimea fragmentelor de restricție** internațional prescurtat RFLP, pronunțat **riflips**.

Scanned with OKEN Scanner

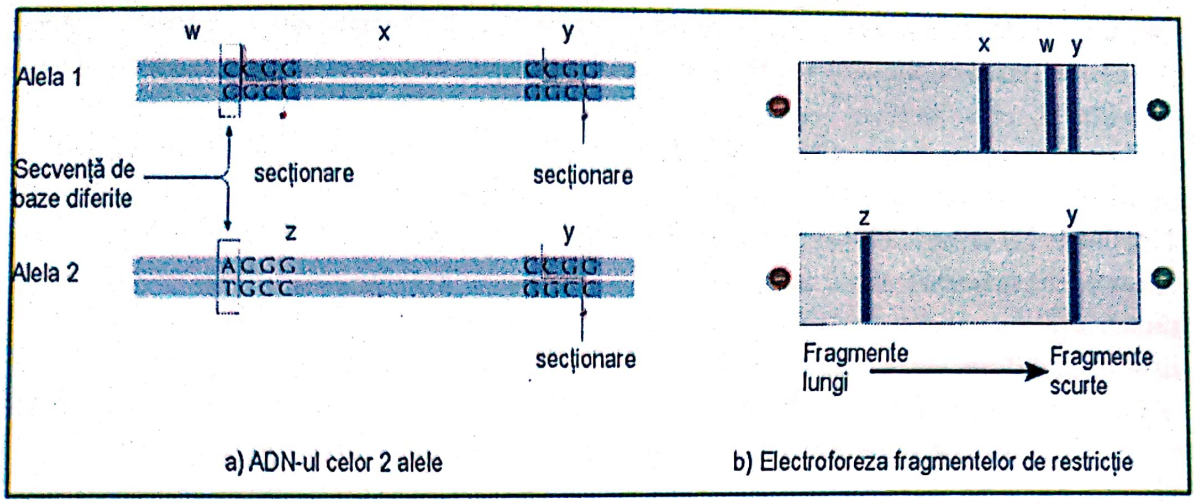


Fig. 163 – Utilizarea fragmentelor de restricție pentru diferențierea alelelor, care imprimă caractere diferite (*prelucrare după diverși autori*)

a) ADN-ul celor două alele se diferențiază unul de altul prin anumite locuri unde se desfășoară secționarea secvențelor de restricție. În desen sunt prezentate numai bazele - cele mai relevante. Enzima de restricție a cărei secvență de restricție este vizibilă secționează ADN-ul alelei 1 în trei părți, segmente (W, X și Y). ADN-ul alelei 2 este însă secționat numai în două segmente (Z și Y).

b) Fragmentele de restricție ale fiecărui ADN alelic este trecut printr-un proces de electroforeză într-un gel poliacrilamidic. În câmpul electric ele se deplasează în direcția indicată de săgeată. Se poate recunoaște o diferență clară între cele două benzi-mostre în gel, benzi corespunzând fragmentelor de restricție W, X și Z. Mostra rezultată din alela 2 are numai două benzi deoarece ADN-ul a fost fragmentat numai în două secvențe X și Z. Mostra de sus are trei benzi pentru că ADN-ul a fost secționat în trei fragmente (W, X și Z)

Conform acestei analize care se poate face acum la diferite specii, pe mai mulți indivizi ai aceleiași specii, a rezultat că la om cea mai mare parte a genomului în procent de **97-98% din ADN nu este implicată în codarea proteinelor**. Aceasta înseamnă că există un număr foarte mare de secvențe diferite care sunt pur și simplu tolerate. În felul acesta se explică pe fond posibilitatea apariției mai multor **locuri de recunoaștere** a enzimelor de restricție, sau, dimpotrivă, dispariția lor, ceea ce conduce la fragmente, mostre individuale. Cercetătorii au folosit această oportunitate pentru a utiliza aceste „diferențieri", „abateri" în structura ADN ca **markeri** moleculari (prin markeri trebuie să înțelegem elemente de marcare, de diferențiere a diferitelor molecule). Markerii sunt folosiți cu prioritate pentru cartarea genetică a mutațiilor la oameni. Mai exact spus, acest polimorfism al markerilor genetici poate servi pentru un anumit domeniu, ADN al genomului care a fost denumit „LOCUS" (plural loci). Un anumit marcher RFLP se poate întâlni într-o populație în numeroase variații, forme, de unde și denumirea de polimorfism genetic.

RFLP-ul poate fi pus în evidență prin metoda hibridizării Southern, iar pentru aceasta este necesară, firește, utilizarea sondei acidului nucleic, marcată radioactiv. Exemplul prezentat în anexa 18 ar putea fi utilizat ca dovadă a prezenței RFLP-ului la indivizi diferiți. Pentru o asemenea comparație, ca material de pornire se folosește genomul în întregimea lui.

Scanned with OKEN Scanner

Cercetările care se fac la oameni utilizează materialul genetic provenit din celulele albe ale sângelui. Metoda de analiză RFLP este deosebit de interesantă deoarece oferă posibilitatea identificării la oameni a unor boli ereditare deosebit de periculoase.

Ştiinţa a demonstrat deja că la oameni există cel puţin 1000 de asemenea boli şi că, în conformitate cu sondajele efectuate în Canada, cel puţin 5% din populaţia în vârstă de până la 25 de ani este afectată de o asemenea boală. Până la sfârşitul vieţii, bolile ereditare pot fi prezente la 50% din populaţie într-o formă sau alta.

Să presupunem că este analizată o familie pe o perioadă de două sau trei generaţii. Prin extragerea unor probe de limfocite (celule albe) se realizează în laborator culturi de celule. Această linie de celule serveşte ca sursă de ADN pentru cercetările care urmează. Ca urmare, persoanele supuse cercetării nu trebuie să doneze în permanenţă sânge.

Etapele cercetării:

1. Probele de ADN ale unui individ se secţionează cu ajutorul mai multor enzime de restricţie (endonucleaze de restricţie).
2. Se supun electroforezei conform figurii 163 şi a anexei 15.
3. După absorbţie, probele vor fi hibridate una după alta cu un set de sonde care corespund, adică se cuplează cu diferitele secvenţe care provin din toate zonele cromozomului analizat (vezi şi anexa 18).
4. Se identifică în acest fel secvenţa RFLP care are o interfaţă, ce reprezintă în familie boala cu transmisie ereditară.
5. Se determină apoi cărei gene şi cărui cromozom îi aparţine această nefastă secvenţă RFLP. Reamintim că membrii familiei prin moştenire poartă această genă de la o generaţie la alta.

În figura 164 sunt prezentate rezultatele unei cartări RFLP ale unei mari familii care este posesoarea unei boli bine definite clinic cu transmitere autosomal dominantă.

1. Probele recoltate de la membrii familiei au fost tratate cu diferite enzime de restricţie de tip endonucleaze şi au fost apoi separate prin gelectroforeză şi în final hibridizate cu sonde ADN pentru toţi cromozomii.
2. Din multitudinea de sonde ADN specifice introduse în „cultură" numai două au fost identificate, cu potenţial care cuplează, hibridează cu cromozomul 20 pe două poziţii (doi loci genici). Aceştia reprezintă secvenţe marker RFLP care în permanenţă interferează cu boala sau mai bine zis cu secvenţa genetică care conservă şi transmite boala. În figură, pentru fiecare cromozom cu nr. 20 cifrele care marchează aceste alele în aceşti loci sunt prezentate una peste alta. Configuraţia $\frac{8}{2}$ din această prezentare şi nu invers (nu $\frac{2}{8}$) indică la numeroşi membri ai familiei prezenţa bolii, sau faptul că individul poartă pericolul apariţiei bolii. Această corelaţie demonstrează că gena purtătoare a bolii ereditare se află pe cromozomul 20 şi se cuplează neapărat cu cele două secvenţe RFLP.

Scanned with OKEN Scanner

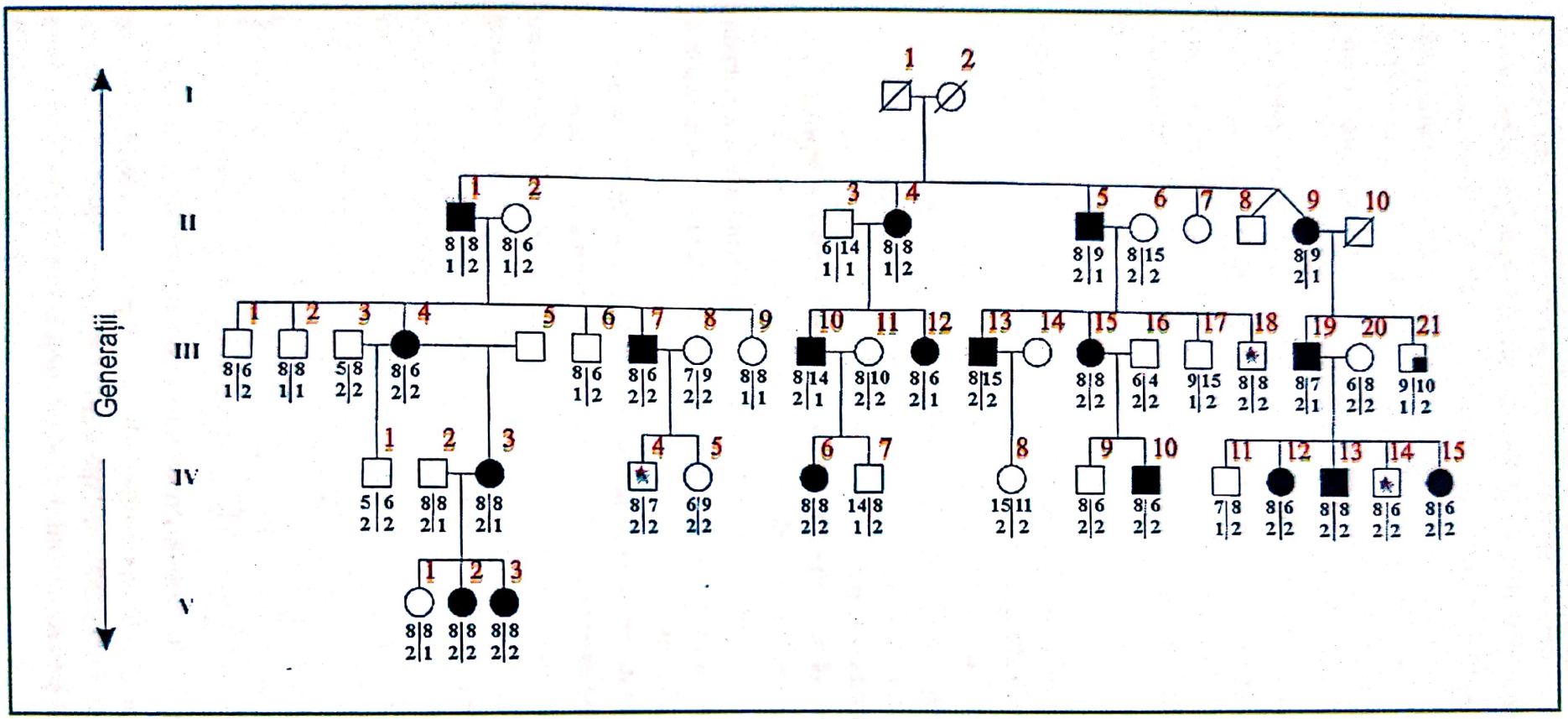


Fig. 164 – Pedigreul unei familii care deține o boală autosomală dominantă asociată cu secvențe marker RFLP.
Alaplotipii care au legătură cu secvențele RFLP sunt redați printr-o combinație de cifre în care alela unui locus este situată deasupra alteia din alt locus. Haplotipii ambilor cromozomi ai unui individ sunt separați printr-o linie verticală. Simbolurile marcate cu o linie diagonală reprezintă persoane moarte. Culoarea neagră marchează indivizii bolnavi prin transmitere ereditară. Simbolul pătrat, cu un sfert înnegrit (III-21) reprezintă un individ care reprezintă un fenotip înrudit, deoarece boala lui se deosebește de a celorlalți membri ai familiei. Persoanele II-8 și II-9 sunt gemeni rezultați din 2 embrioni. Cazurile marcate cu o steluță (III-8, IV - 4 și IV - 19) sunt considerați ca insuficient de clarificate datorită unei penetrări insuficiente a bolii. Persoanele sigur bolnave sunt notate cu configurația ( ) și boala lor se datorește moștenirii genetice. Aceste persoane dețin un cromozom ce vine dintr-o evoluție comună a familiei (*Lepert și colab., Nature 337 (647-648), 1989*)

Scanned with OKEN Scanner

Corelaţia între configuraţia $\frac{8}{2}$, adică aceea care exprimă posibilitatea apariţiei bolii ereditare şi apariţia reală a acesteia nu este însă de 100% ci de peste 96%, adică > 0,96. Excepţiile în acest caz sunt date de persoanele III-18, IV - 14. Aceste două cazuri fac excepţie probabil datorită unei penetrări incomplete a bolii sau datorită unor greşeli de diagnostic. Configuraţia ($\frac{8}{2}$) nu a fost însă limitată numai la această familie ci şi la persoanele înrudite cum ar fi de exemplu II-6, III-3, III-20 şi IV - 2. Aceşti indivizi ar putea declanşa în generaţia următoare moşenitori bolnavi de aceeaşi boală erditară. În afara locaţiilor de restricţie în arborele genealogic pot fi căutate şi alte secvenţe marcher care ar putea conduce la segregarea unor boli genetice. Este vorba aici de polimorfisme în ceea ce priveşte numărul de secvenţe repetabile în tandem (Variable number of tandem repeats) VNTRs, care pot de asemenea să fie cercetate cu ajutorul tehnicii Southern-Blotting sau al reacţiilor lanţurilor polimeraze.

Deşi asocierea sau corelaţia între unul sau mai multe secvenţe marcher RFLP şi o boală genetică există, aceasta nu demonstrează 100% că acest cuplu genetic funcţionează sau că el există. La alte organisme în afara omului acest cuplu a fost stabilit statistic ca urmare a unor încrucişări între numeroşi indivizi cu însuşiri genetice cunoscute prin cercetarea urmaşilor, a moştenitorilor obţinuţi. La oameni, dotarea genetică a părinţilor este foarte greu de stabilit, uneori din cauza unor probleme morale şi etice care le ridică şi poate şi pentru faptul că numărul celor dispuşi să cedeze „probe" este foarte mic. De aceea se foloseşte o metodă statistică ce permite să se calculeze mărimea probabilităţii unui cuplu între apariţia bolii genetice şi secvenţa marcher RFLP. Acest lucru se calculează momentan prin determinarea aşa-numitelor valori **LOD** (likelihood of the odds, LOD).

Pornind de la numărul de fraţi şi surori şi luând în considerare posibilitatea configurării unei boli genetice din partea părinţilor (cis sau trans), un program pe computer poate elabora o ecuaţie care conţine o valoare dată θ, privind frecvenţa recombinărilor. Pentru fiecare grupă de cupluri (foarte rară) ecuaţia poate fi rezolvată cu diferite valori θ care se află în intervalul 0 şi 0,5 (de exemplu 0,01, 0,10, 0,20 etc.). În continuare se alcătuiesc grupaje, intervalele pentru fiecare rezultat şi final pentru rezultatul $\theta = 0,5$. Se deduce astfel frecvenţa recombinaţiei aşteptată la o repartiţie necorelată. Valorile astfel obţinute sunt logaritmizate. Apoi se adună valorile logaritmice ale cuplurilor (frate, soră) pentru frecvenţa de recombinare. Dacă suma este + 3 sau mai mare, apare probabilitatea existenţei unui cuplu între cele două secvenţe care realizează frecvenţa recombinativă într-un raport de cel puţin 1000 : 1, adică boala apare cu o frecvenţă de 0,1%. Dacă, dimpotrivă, valoarea θ este de - 2, cuplarea genetică a celor două secvenţe este foarte improbabilă. În cazul cartării genetice a familiei prezentată în figura 165 întâlnim suficiente grupe de fraţi care realizează pentru amândouă secvenţele RFLP de marcare o valoare logaritmică de +3,12 pentru indici $\theta = 0,003$ şi 2,87 pentru $\theta = 0,039$. Aceste valori reprezintă indicatori puternici pentru a demonstra existenţa şi transmiterea bolii genetice de la o generaţie la alta. În concluzie, putem deci afirma că analiza RFLP a devenit de mare importanţă în diagnoza bolilor cu transmisie ereditară ca şi în medicina legală (juridică). Ea a deschis drumul spre alte realizări foarte importante ale tehnologiilor genetice. ■

Scanned with OKEN Scanner

2.6. ALTE PROGRESE OBȚINUTE ÎN BIOLOGIE CA URMARE A DESCOPERIRII TEHNICILOR BIOMOLECULARE

Toți marii cercetători ai lumii sunt de acord că prin punerea la punct a tehnicilor necesare transformării genetice a organismelor s-au deschis căi și domenii noi în domeniul biologiei. Fuga după gene necesare producerii de energie l-a făcut pe Craig Venter să elaboreze un proiect major în domeniul creării unei bacterii superspecializate care să producă hidrogen din apă ca urmare a fotosintezei. Se realizează lucruri greu observabile în natură, fenomene naturale care se derulează cu o intensitate redusă, pot fi amplificate de mii de ori, poate de milioane de ori. Într-un capitol special se va prezenta acest proiect al lui Craig-Venter ca și cel al lui Uwe Schröder de producere a biopilelor electrice. Biotehnologiile pătrund în toate domeniile. Ele trebuie în permanență să țină cont de ceva foarte important și anume de structura și funcțiunea genelor. Avantajul acestor metode constă în aceea că în general acestea, adică nici structura, nici funcțiunile nu sunt neapărat corelate cu expresia genelor. În consecință, geneticienii pot să studieze genele direct fără ca primordial să țină cont de fenotip sau genotip așa cum se întâmplă în genetica clasică. Genele sunt scoase deci din context și studiate individual pe trei direcții importante, și anume:

- cum este organizată o anumită genă;
- care anume secvențe regulatorii se află în apropierea lor;
- cum poate fi regularizată gena studiată.

La fel de importante sunt și întrebările contrare:

- Care este funcția produsului genă?
- Trebuie oare fenotipul să fie o derivație a genotipului?

Această întrebare este justificată de faptul că foarte adesea cercetătorii clonează și identifică gene fără a cunoaște produsul proteic implicat. Este, de exemplu, posibilă identificarea unui mARN care se află într-o anumită fază de evoluție a unei celule. Prin clonarea cADN-ului se poate obține gena specifică mARN-ului în cauză precum și secvența aminoacizilor, a proteinelor care codează. Un lucru rămâne însă necunoscut și anume: **cum se poate dovedi care sunt funcțiile biologice ale acestei gene?** Și totuși, și acest lucru este posibil. Pentru aceasta s-a elaborat o tehnică „suficientă" denumită **mutageneza in vitro**, prin care modificările specifice ale bazelor sunt dirijat introduse într-o secvență a unei gene care se clonează. Se obțin în felul acesta mutații punctuale sintetice care pot modifica funcțiile produsului proteic.

Descrierea mutagenezei *in vitro* este prezentată în anexa 19. Dacă gena mutantă este introdusă într-o celulă a unui organism stabil, se pot produce modificări în fiziologia sau dezvoltarea mutantei determinate de funcțiile în cauză.

Prin mutageneza *in vitro* centrul activ al enzimei este în mod intenționat lăsat să varieze. Acest lucru conduce la dezvoltarea unei tehnici de mare finețe într-un domeniu de cercetare foarte dinamic și anume „protein-design".

Prin hibridizare se pot descoperi secvențe ADN identice cu cele ale genei care se clonează. Aceste secvențe oferă informații asupra dezvoltării evolutive a genelor învecinate sau a genelor apropiate constructiv. În cazul că sonda unui cADN originar

Scanned with OKEN Scanner

face posibilă tehnica hibridizării oferind biologilor ca gena studiată să fie legată de un ADN și să poată fi studiate secvențele care codează și reglează, atunci aceste cercetări, conform cunoștințelor noastre și-au adus o mare contribuție la o dramatică dezvoltare a organizării și reglementării genelor în ultimii ani.

O sondă ADN poate de asemenea să fie folosită pentru localizarea unei gene aparținând unui cromozom eucariotic. Tehnica este denumită **hibridizare in situ** (adică la locul natural) și se bazează pe cuplarea perechilor de baze specifice ale sondei cu secvențele complementare prezente în cromozomul intact (legătura, cuplarea, hibridizarea se face obișnuit prin punțile de hidrogen) fixat pe un obiect purtător (in situ). Prin autoradiografiere sau colorare, locația care poartă această genă este imediat vizibilă (fig. 165).

Într-un mod asemănător o sondă poate fi folosită și pentru captarea, legarea la un mARN pentru a putea fi depistabile celulele unui anumit segment al unui țesut care este exprimat (creat) de această genă.

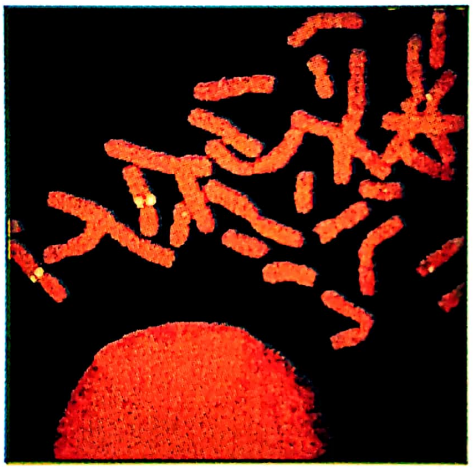


Fig. 165 – Secvențe complementare descoperite cu ajutorul sondei ADN, căutate și marcate pe diferiți cromozomi umani.
Secvența în cauză căutată poate să fie pozitivă, adică să poarte alelele unei însușiri umane pozitive (o anumită capacitate specială) sau negativă (de regulă inducerea unei boli cu moștenire genetică) (*după Lodish și colab., 2001*)

Asemenea experimente sunt de mare importanță în dezvoltarea biologiei. Tehnologiile genetice permit de asemenea fabricarea unei mari cantități de gene și producția unei cantități la fel de mari de proteine, care, altminteri în celulele naturale sunt disponibile numai în cantități foarte mici. Acest lucru este de asemenea foarte important pentru că numeroasele proteine sunt profund implicate în schimbul de substanțe care controlează organismul. Pentru cercetarea funcțiilor acestora este necesară producerea lor în cantități mari, ceea ce se poate face prin clonare *in vitro*.

Numeroși cercetători lucrează deja utilizând noile tehnologii la elaborarea unor cataloage care să cuprindă toate proteinele implicate în activitatea unui organ, cum ar fi creierul. Acest procedeu a fost dezvoltat tocmai pentru ca biologii să nu mai determine așa de multe proteine așa cum procedau prin folosirea testelor enzimatice

Scanned with OKEN Scanner

sau imunologice. În locul acestora se poate fabrica un cADN specific, complementar mARN-ului unui anumit organ care apoi este clonat în bacterii, după care se poate fabrica atât de mult din fiecare proteină cât este necesar pentru cercetare. Pentru derularea unor proiecte atât de ambiţioase fireşte că „diavolul zace în detalii", adică realizarea lor necesită numeroase grupe de cercetare, foarte multă muncă şi foarte mulţi bani. Actualele evaluări indică că numai în creiere ar trebui identificate mai multe zeci de mii de proteine.

Nu putem încheia acest capitol decât cu afirmaţia că pentru a obţine mutante speciale, punctiforme, există o serie întreagă de metode puse la punct de către numeroşi cercetători. Unele dintre ele sunt sintetizate, de exemplu, în lucrarea „Moleculare Biotechnologie" scrisă de cuplul englez Bernard R. Glick/Jack J. Posternak încă din 1995.

Se prezintă mai multe metode de obţinere a acestor mutante. Timpul trecut de atunci face ca unele date să fie depăşite de experimentări mai noi în acest domeniu. Din aceste motive vom enumera numai două dintre ele, despre una vorbindu-se deja anterior.

a) **Mutageneză coordonată de oligonucleotide cu ajutorul ADN-ului m-13.** Această metodă prezentată sintetic în anexa 20 trebuie să îndeplinească următoarele condiţii:
   - trebuie să fie cunoscută secvenţa nucleotidică din zona ADN care conţine codonul căutat;
   - trebuie cunoscuţi, de asemenea, aminoacizii care fac obiectul schimbului.

   În cel mai utilizat procedeu gena este introdusă în forma dublu-bandă a unuia din bacteriofagii M-13. Apoi se izolează forma monoband (M13 - (+) - banda) a vectorului recombinat şi se amestecă ADN-ul cu un oligonucleotid sintetic. Oligonucleotidul conţine o secvenţă care, cu excepţia unui nucleotid este complimentar în gena clonată. Schimbul nucleotidic (perechea lipsă) corespunde exact nucleotidului codonului mARN care trebuie modificat.

b) **Mutageneza - P.C.R.** este prezentată în anexa 17 şi vine de la englezescul Polimerase Chain Reaction, pe care am prezentat-o într-un capitol anterior. ■

Scanned with OKEN Scanner

3. GENOMUL UMAN - OBIECTUL DE STUDIU AL UNUI MARE PROIECT

Nu se cunoaşte încă un proiect de cercetare de o amploare atât de mare şi care să fi reuşit să mobilizeze atât de numeroase forţe umane. Tema proiectului a fost aceea de a descifra şi inventaria în întregime secvenţele nucleotide ale genomului uman. Cercetările au început în a doua parte a anilor '80 şi continuă şi astăzi, deşi sunt foarte mulţi aceia care susţin că genomul uman a fost în întregime decodificat. A existat şi există încă o adevărată competiţie între diferite laboratoare ca şi între foarte numeroşii cercetători din domeniu.

Pentru obţinerea acestor rezultate prin cercetare, specialiştii au utilizat patru strategii în patru etape (Neil Campbell, 2000), dar care nu se mai regăsesc în aceeaşi lucrare („Biologie", îmbunătăţită şi republicată în 2003) într-o ediţie revizuită şi completată, decât în forme modificate. Sinteza din 2000 nouă ni se pare foarte potrivită prin modul mai simplu de prezentare, motiv pentru care o prezentăm în continuare foarte succint. Aşadar, următoarele strategii au fost propuse:

1) Cartarea genetică (analiza cuplurilor) a genomurilor umane

Primul scop a constat în localizarea a cel puţin 3000 de markeri, adică acele gene sau alţi loci identificabili existenţi pe ADN, care sunt uniform repartizaţi pe cromozomi. Această inserţiune a fost posibilă datorită marii diversităţi a RFLP-ului în genomul uman. De fapt, încă din 1980 biologul David Botstein şi colegii lui au propus ca variantele genetice indicate prin RFLP să poată constitui baza alcătuirii unei hărţi detaliate a genomului uman.

2) Cartarea fizică a genomului uman

Strategia constă în secvenţionarea fiecărui cromozom cu ajutorul enzimelor de restricţie într-un număr credibil de fragmente urmată de ordonarea lor exactă pe cromozom. Metoda migrării cromozomilor (chromosome walking) reuneşte mai multe tehnici despre care s-a vorbit anterior, metode care au permis accelerarea cartării cromozomilor (fig. 166).

3) Secvenţionarea genomului uman

În această parte a proiectului este identificată exact derularea nucleotizilor ADN pe fiecare cromozom (n=23, 2n=46). Studiile de până în prezent au ajuns la concluzia că genomul uman conţine circa 40.000 de gene după ce iniţial fuseseră avansate peste 100.000 de gene. Numărul foarte exact nu poate fi precizat nici astăzi. Se poate afirma totuşi că pentru perechea de cromozomi haploizi ai omului există circa 3 miliarde perechi de baze şi că identificarea lor constituie în momentul de faţă partea cea mai importantă a proiectului.

Scanned with OKEN Scanner

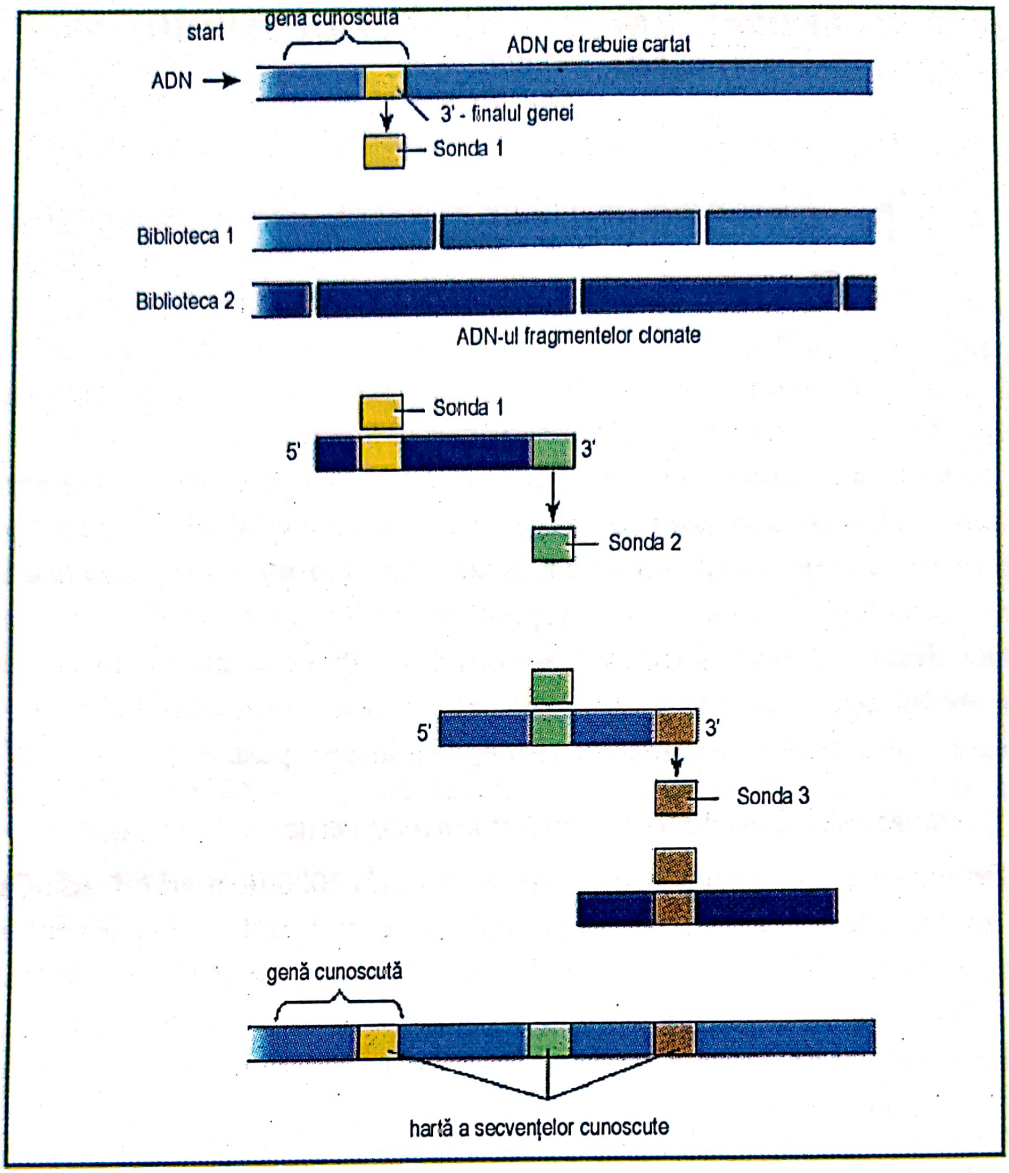


Fig. 166 – Metoda cromozomilor migratori (walking chromosomes).
Experienţa începe cu o genă cunoscută sau cu un segment ADN clonat şi deci cunoscut iar acesta „migrează", se deplasează de la locul iniţial de-a lungul ADN-ului cromozomal, căutând toate genele sau fragmentele „de suprapunere", adică similare obţinute prin secţionare cu enzime de restricţie pentru a se obţine bibliotecile ADN. Aceasta, ca şi alte metode de ordonare a fragmentelor ADN se potiveşte acelor secvenţe nucleotide stabile, care nu se modifică de-a lungul segmentului ADN (nesăritoare). Harta fizică care rezultă constă într-o ordonare a fragmentelor identificate ca urmare a secţionării mai multor regiuni ale cromozomului de fiecare dată utilizându-se sonda ADN din finalul secvenţei.
1. Se fabrică o sondă din partea finală a genei (sonda 1)
2. ADN-ul de bază, de primire este secţionat cu ajutorul a două enzime de restricţie şi apare biblioteca 1.
3. Se foloseşte sonda 1 pentru a căuta în biblioteca 2 acele fragmente ADN care se suprapun genei cunoscute.
4. Gena căutată hibridează cu sonda 1 iar ADN-ul este izolat din clona formată. O nouă sondă trece şi apare în partea finală 3.
5. Cu sonda 2 este examinată biblioteca 2 şi sunt căutate fragmentele specifice acesteia.
6. În fazele 4 şi 5 sunt în continuare şi alternativ repetate, căutându-se noi fragmente ce trebuie identificate pe această cale. ADN-ul se deplasează, migrează dintr-o parte în alta.
7. Rezultatele constau în obţinerea unei hărţi cu o serie de markeri (secvenţe) cunoscuţi, într-o anumită înşiruire, întrerupţi prin benzi de asemenea cunoscute
(*Ilustraţie după o idee a lui Campbell, 2000*)

Scanned with OKEN Scanner

4) Continuarea analizei genoamelor altor specii

Cea de-a patra parte a proiectului se referă la continuarea analizei genoamelor altor specii şi în special a microorganismelor, foarte valoroase ca organisme gazdă sau ca ofertă de gene, pentru numeroase reparaţii genetice în bolile cu transmitere ereditară.

Următoarele specii foarte importante din punct de vedere genetic sunt astăzi atent urmărite: ***Escherichia coli, Mycoplasma, Haemophilus, Methanococus*** (ca bacterii) şi ciuperca ***Sacharomices*** (hefele ciupercii berii) al cărui genom are multe similitudini cu cel uman.

La fel de urmărite sunt şi: ***Drosophila, Caenorhabditis*** (nematod), ***Arabidopsis thaliana*** (planta care serveşte la controlul şi evoluţia genetică a plantelor).

În acest scop vezi şi lucrările consorţiului „International Human Genome Sequencing", revista „Nature" 2000, pag. 860-921, ale consorţiului „The Araidopsis Genome Initiative" – Nature, pag. 408, 796-815 (2000), ale consorţiului C.elegans „Science" nr.282/1998, ca şi recentele publicaţii ale lui Venter şi colab. – Science nr.291/2000, pag. 1304-1351.

Deşi se spera în finalizarea proiectului genomului uman până la sfârşitul anului 2003, acest lucru nu a fost posibil, pentru că fiecare descoperire nouă aduce cu sine noi detalii ce implică noi căi de căutare.

Succesul finalizării acestui proiect depinde foarte mult de progresele tehnicii ce se vor obţine pe termen scurt în automatizarea secvenţionării ADN-ului ca şi a prelucrării şi analizei datelor. Pentru această dezvoltare, viteza de lucru a computerelor este şi ea necesară. ■

3.1. TEHNOLOGIA GENETICĂ ÎN MEDICINĂ ŞI INDUSTRIA FARMACEUTICĂ

Aşa cum se mişcă lucrurile azi în lume, nu există zi în care în media ştiinţifică să nu apară un raport ştiinţific asupra unui nou model, unui nou rezultat biotehnologic destinat rezolvării unor probleme de medicină. Direcţiile de cercetare şi implementare a rezultatelor sunt următoarele:

1) Identificarea genelor, conform proiectului uman prezentat mai sus, a căror mutante sunt responsabile de transmiterea şi declanşarea unor boli genetice. Aceste identificări sunt extrem de importante pentru depistarea căilor reale ce conduc spre diagnoză şi apoi spre terapia sau blocarea evoluţiei bolii.
2) Tehnologiile genetice pot fi utilizate de asemenea în elaborarea unor noi metode de diagnosticare a numeroase boli foarte complicate pornind de la artrită, trecând prin cancer şi până la boala retrovirală SIDA. Deşi multe din aceste boli nu sunt de sorginte genetică, ele sunt influenţate de către anumite gene care, de asemenea, ar trebui identificate, cartate şi apoi utilizate.
3) Boli de diferite provenienţe sunt condiţionate de modificarea expresiei genetice a ADN-ului în celulele afectate. Adeseori este afectat imunosistemul pacienţilor. Prin analiza microarray-ADN sau prin alte metode bine puse la punct sau în curs de elaborare, se reuşeşte compararea expresiei genetice a ţesuturilor sănătoase

Scanned with OKEN Scanner

cu a celor bolnave, în scopul identificării a numeroase gene care stau la baza „determinării" unei boli, putându-se apoi să se decupleze genetic fenomenul de inducere a bolii. Genele şi produsele lor sunt posibile teme majore privind prevenţia sau terapia bolilor.

Diagnoza gentehnologică a unor boli

Diagnoza unor boli contagioase a început să capete dimensiuni în mod deosebit prin utilizarea metodei P.C.R. (reacţia în lanţ a polimerazei) (vezi anexa 17) ca şi a marcării cu sonde a acizilor nucleici. Prin aceste două metode se reuşeşte localizarea diferiţilor patogeni.

1. Un exemplu în acest sens este următorul:
   a) Secvenţa ADN a virusului HIV este cunoscută şi ca urmare
   b) ADN-ul HIV-ului se înmulţeşte cu P.C.R. şi în felul acesta HIV-ul devine uşor depistabil în probe de sânge sau ţesuturi. Aceasta este calea cea mai potrivită, toate celelalte metode fiind insuficient de cuprinzătoare şi deci necesită o repetabilitate uneori obositoare. Există însă numeroase tehnici biotehnologice care nu folosesc neapărat genele în diagnosticarea unor boli infecţioase. În continuare nu facem decât să le testăm. Ele sunt tratate în detaliu în lucrarea „Biotehnologii moleculare" de Bernard Glick şi Jack Gasternak (ASM Press, Washington DC, 1994).
2. Cercetătorii care lucrează în laboratoarele de medicină dispun astăzi de metode genotehnice pentru diagnosticarea a sute de boli. Acest lucru este cu atât mai avantajos cu cât s-a demonstrat faptul că diagnoza gentehnologică reuşeşte să depisteze boala cu mult înaintea apariţiei simptomelor iar pentru bolile genetice, chiar în faza prenatală. Există, de asemenea, posibilitatea identificării unor alele libere de simptome, adică nepurtătoare de simptome, dar care ar putea să devină purtătoare ale unei eventuale îmbolnăviri. Altfel spus, poate fi determinat „potenţialul de îmbolnăvire" cu o anumită boală, chiar dacă boala nu este prezentă în momentul efectuării analizei.
3. Pentru numeroasele boli cu transmitere ereditară (şi acestea sunt deja peste 1000 ca fiind depistate), au fost deja clonate numeroase gene. În acest sens amintim:
   - gena pentru declanşarea hemofiliei (boală ereditară transmisă de mamă băieţilor şi care constă în coagularea foarte redusă a sângelui);
   - gena fibrozei chistice (dezvoltarea unei tumori fibroase de fibroame în diverse ţesuturi sau organe);
   - distrofie musculară tip Duchennesch (boală ereditară prin care musculatura rămâne nedezvoltată).
4. Studiile de hibridizare au putut să scoată în evidenţă, să detecteze alele anormale ale unei gene dintr-o anumită probă de ADN. Acest lucru este astăzi posibil chiar şi în cazurile în care gena nu a fost încă clonată, cu condiţia să dispunem de un marker RFLP strâns cuplat cu alela respectivă (fig. 167).

Scanned with OKEN Scanner

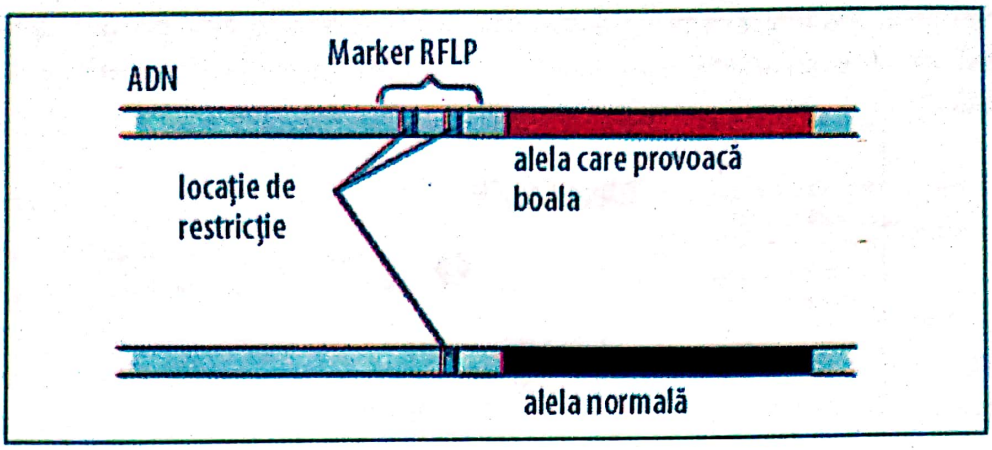


Fig. 167 – Markerul RFLP în apropierea unei gene.
Depistarea unei alele care induce boala poate fi realizată cu mare probabilitate, chiar dacă gena din care face parte nu a fost clonată. Acest lucru poate fi realizat în prezența unui marker RFLP. (Fragment de restricție - polimorfism lung) care este însă cunoscut și care este poziționat în imediata apropiere a genelor căutate. Figura de mai sus indică fragmente omoloage de ADN aparținând unei familii în interiorul căreia anumiți membrii suferă de o boală ereditară. În această familie se întâlnesc diferite modele ale unor markeri RFLP în legătură cu diferite alele. În această situație în care markerul este cunoscut, testul este posibil. Dacă un membru al familiei deține o versiune a markerului RFLP cu două locații de secvenționare (în locul uneia singure) prin moștenire, atunci el deține cu o mare probabilitate alela care îi va declanșa boala (*ilustrație după Neil Campbell, 2003*)

Alela care induce boala Chorea Huntington și un mare număr de alte boli ereditare au fost descoperite pe această cale. Alte căi sunt, de asemenea, posibile și sunt astăzi în cercetare și dezvoltare. ■

3.2. POSIBILITĂȚI DE TERAPIE GENETICĂ LA OAMENI

Tehnologiile care rezultă din manipularea genelor oferă astăzi un mare potențial pentru tratamentul a numeroase boli prin utilizarea terapiei cu gene, adică prin modificarea dirijată a unei gene inductoare a bolii la un pacient.

Boala este indusă, de regulă, de un defect al unei gene. În acest caz este foarte posibil ca gena defectă să fie înlocuită sau să fie înlocuit numai nucleotidul, adică cauza de inducere a bolii de către gena defectă.

Noua alelă (adică porțiunea de genă defectă) poate fi introdusă în celulele somatice ale țesuturilor bolnave. În acest caz spunem că am aplicat o terapie cu **gene - somatică** (sau o terapie somatică cu gene).

Pentru ca terapia cu gene a celulelor somatice să fie de durată, să vindece, ar trebui ca celulele care au primit alela normală să se înmulțească pe întreaga perioadă de viață a pacientului.

I. Cei mai buni candidați la această terapie îi constituie țesuturile măduvei osoase care dețin și celule adulte precum și celulele sângelui și ale imunosistemului.

Scanned with OKEN Scanner

În figura 168 se prezintă o posibilă intervenţie într-o situaţie în care celulele măduvei osoase, din cauza unei gene defecte nu mai produce o enzimă funcţională extrem de utilă.

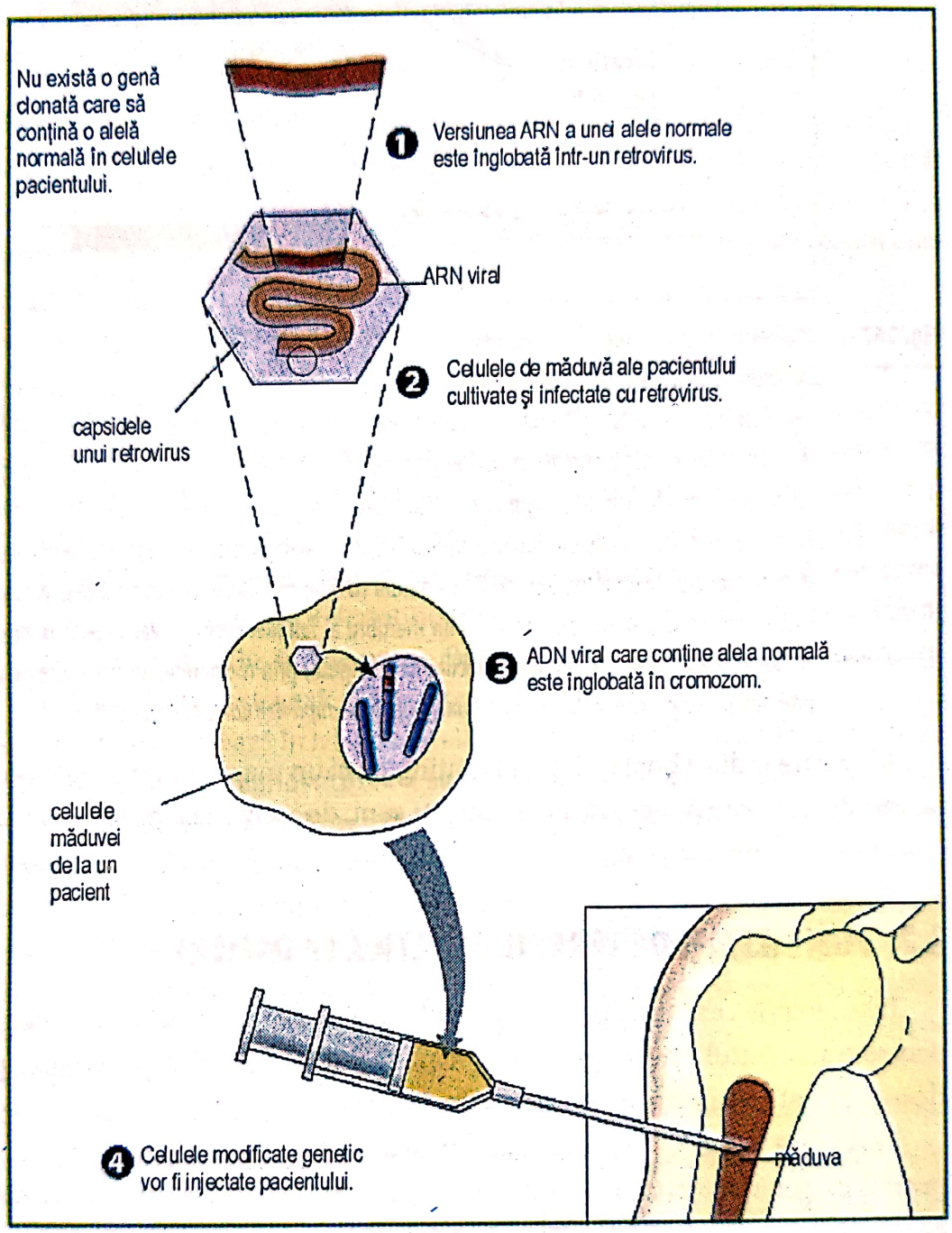


Fig. 168 – Repararea defecţiunilor genetice ale măduvei unui bolnav ce deţine gene defecte în celulele măduvei. Metoda foloseşte drept vector un virus consolidat care va prelua alela normală a unei gene şi o va introduce în celulele unui pacient bolnav din cauza unor gene defecte. La baza acestei metode stă de fapt construcţia copiei genomului retrovirusului (care este de fapt un ADN-transcript a genomului sau ARN - un cromozom) în cromozomul ADN al celulei gazdă (vezi fig. 112). Acest genom - virus conţine o genă străină care în final trebuie să se exprime. În felul acesta celula, ca şi toate urmaşele sale mitotice primesc noua proteină reparatorie iar pacientul, în caz de evoluţie normală se însănătoşeşte. Celulele care se vor înmulţi pe întreaga durată a vieţii, cum se întâmplă cu cele ale măduvei, sunt de regulă potrivite pentru genterapia somatică

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a realiza materialul genetic tip medicament se vor recolta de la pacient câteva celule defecte ale măduvei. Alela normală este introdusă în genomul celulei defecte cu ajutorul unui virus-vector care va transmite alela normală genomului care conţine gena defectă.

Gena defectă va fi deci reparată prin înlocuirea proteinei (celulei) care a produs defecţiunea, cu o proteină (alelă) normal predestinată acestei funcţii. Celule de măduvă „normalizate" în acest fel vor fi injectate în măduva pacientului.

Dacă tratamentul este unul reuşit, atunci celulele noi se vor înmulţi pe întreaga perioadă a vieţii pacientului, înlocuindu-se cele care conţin gene defecte şi provocând de fapt însănătoşirea bolnavului prin manifestarea unei noi exprimări genetice, adică prin fabricarea proteinei care lipseşte şi prin manifestarea însuşirilor acesteia.

Cu toate că mass-media s-a manifestat foarte euforic vizavi de aceste proceduri, putem afirma că teoretic lucrurile par a fi rezolvate.

În realitate, implementarea în practică a unor asemenea proiecte s-a dovedit a fi o problemă mult mai grea, în primul rând din cauza lipsei de practică clinică în acest domeniu şi din cauza apariţiei unor fenomene destabilizatoare, care au făcut ca „repararea genetică" să nu devină una de durată.

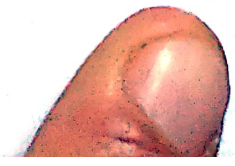
În ultimii 10 ani, de fapt, foarte puţine rapoarte ştiinţifice pe această temă au fost într-adevăr bine fundamentate indicând succese reale. Numeroase cazuri însă nu au fost încununate de succes.

Puţinele succese înregistrate în terapia hemofiliilor nu au descurajat însă pe cercetători, care au trecut la rezolvarea prin această metodă a unor boli provocatoare de moarte, cum ar fi bolile de inimă şi îndeosebi infarctul sau cancerul.

În unele cazuri, cum este tratamentului infarctului miocardic, transferul unor gene reparatorii nu numai că este necesar dar este şi dorit. Noua genă care se implementează nu numai că repară, dar ea conţine codul unei informaţii asupra unui stimulator care stimulează formarea unor noi vase sanguine care să înlocuiască pe cele blocate. Experienţe efectuate la porci (animal înrudit genetic cu omul) s-au dovedit încununate de succes. Acum se derulează experienţe atât pe porci cât şi pe oameni pentru mărirea siguranţei metodei (îndeosebi la oameni).

Două grupe de cercetători lucrează la acest subiect, şi anume:

1) O grupă care foloseşte acelaşi vector ca şi la porci, adică un adenovirus (agentul foarte frecvent al gripelor) care este modificat genetic de o asemenea manieră încât el nu mai provoacă gripa.
2) O a doua grupă care injectează „factorul stimulator de creştere" direct în muşchiul inimii. Acesta conţine proteina dar nu şi vectorul. Vectorii virali sunt repede distruşi de către imunosistem şi de aceea injectarea directă a acestora este ineficientă. Scopul experimentului este de a stimula noi celule ale inimii care să fabrice factorul stimulator şi după o perioadă scurtă de activitate să inducă creşterea vaselor de sânge. Cercetările în curs de desfăşurare se dovedesc a fi extrem de încurajatoare.



Scanned with OKEN Scanner

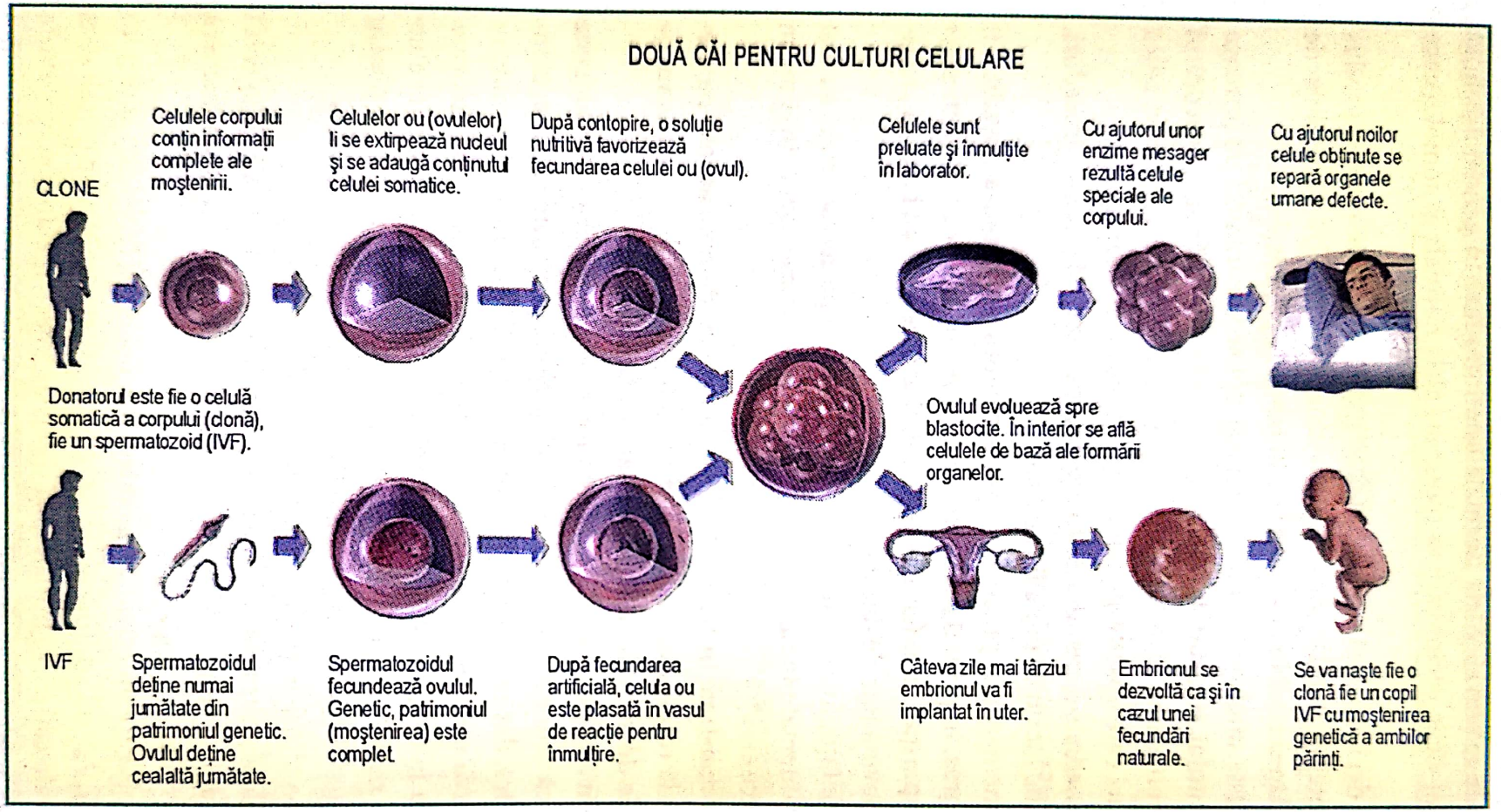


Fig. 169 – Două căi de obținere a culturilor de celule și a clonării lor în vederea pregătirii pentru tratament a unor celule specifice diferitelor organe .
1) În figură se prezintă două căi prin care se poate obține materialul genetic reparatoriu. Calea de sus care pleacă de la o celulă adultă ce conține întreaga informație ereditară și al cărui conținut genetic (genomul) este inclus în celula ovul după ce acesteia i-a fost extras genomul. Rezultă o celulă fecundată.
2) La aceeași celulă fecundată se ajunge și ca urmare a fecundării in vitro a ovulului și spermatozoidului (in vitro fertilization), adică IVF. În cazul clonării, celula-ou (embrionul) evoluează spre obținerea în laborator prin dirijare specifică enzimatică și nutritivă a unor celule specifice organelor dorite (inimă, ficat, pancreas etc.). Acestea se injectează bolnavului, care dacă tratamentul a fost bine făcut, ar trebui să se vindece. În cazul IVF ca și al clonei se poate obține pe a treia cale (de jos), fie un copil clonat, fie unul de proveniență IVF (*Ilustrație după Wilmut Ian - Focus 46, 10 nov. 2003*)

Scanned with OKEN Scanner

II. O altă grupă de efecte terapeutice sunt acelea care rezultă din clonarea celulelor specifice embrionare sau din clonarea somatică. Ne este cunoscut aici că încă din primele faze de dezvoltare embrionară (fig. 169) se formează celule care conţin informaţia necesară dezvoltării organelor umane.

Conform schemei prezentate, celulele cu material genetic necesar tratării organelor bolnave se poate obţine fie prin clonare, fie prin fecundare ***in vitro*** (IVF), în acest ultim caz utilizându-se numai embrionii rămaşi disponibili în vasele de reacţie după fecundare.

Schema din figura 169 a fost livrată departamentului de cercetare al revistei Focus de nimeni altul decât Ian Wilmut, părintele de-acum celebrei clone Dolly.

Pornind de la acelaşi principiu, cercetătorii sud-coreeni au fabricat primul embrion uman clonat conform schemelor din figura 170.

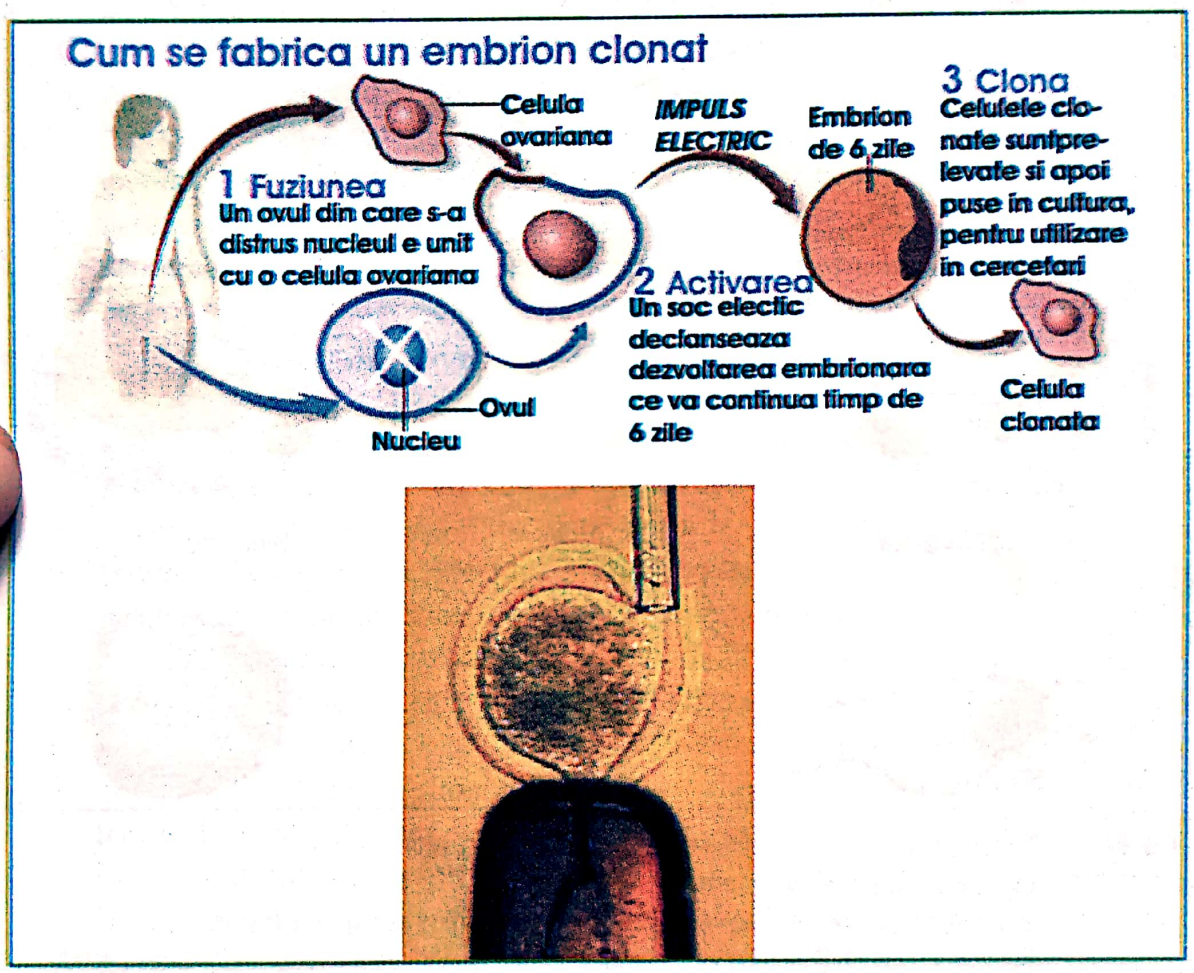


Fig. 170 – Fabricarea unui embrion clonat.
Primul embrion uman clonat a fost obţinut într-un laborator din Coreea de Sud după schema alăturată (*Science et Vie 1039, aprilie 2004*)

În prima fază, ovulului i se extirpă nucleul şi apoi este unit cu o celulă ovariană somatică. Are loc un nou transfer nucleic. Noua combinaţie este supusă unui impuls electric, care va declanşa o dezvoltare embrionară, fără a fi prezent acolo nici un spermatozoid. Embrionul se lasă să crească până în faza de 6 zile după care:

Scanned with OKEN Scanner

a) Se selecţionează celule clonate specifice pentru diverse utilizări terapeutice cum ar fi:
   – Celule nervoase, pentru înlocuirea celulelor nervoase în creier, celule pancreatice etc. (fig. 171).

Celulele de pornire se mai numesc şi celule de bază sau celule suşe. Embrionul poate fi obţinut conform figurii 169, fie după schema din figura 170.

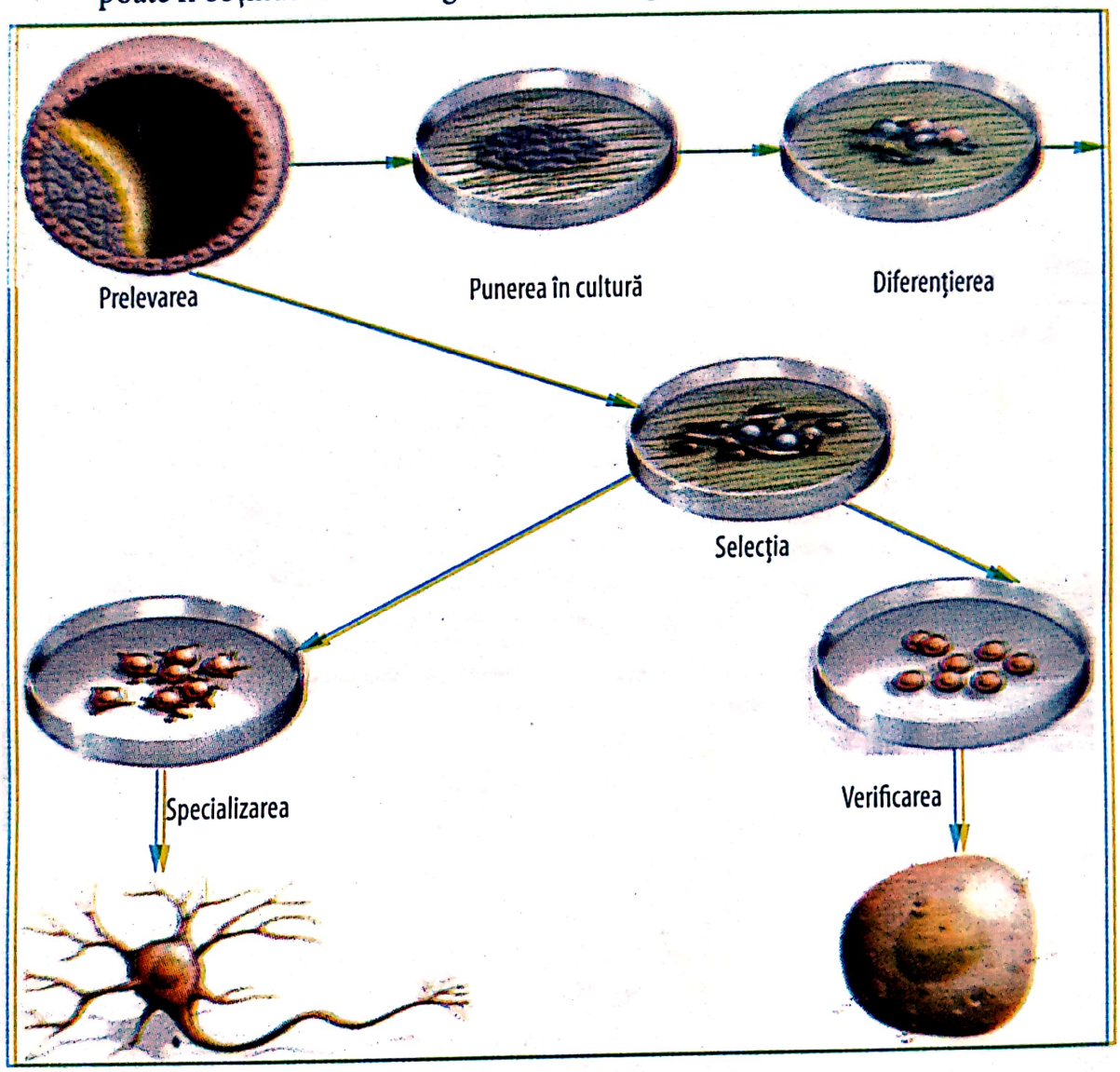


Fig. 171 – Transformarea celulelor de pornire, suşe, clonate etc. în ţesuturi.
Etapele acestui proces sunt următoarele:
Prelevarea: Dintr-un embrion de 5 zile menţinut ***in vitro*** se extrag celulele suşe.
Punerea în cultură: Ele se plasează într-un mediu nutritiv specific, ce le favorizează multiplicarea specifică.
Diferenţierea: Un amestec de seleniu (oligoelement) şi hormoni declanşează activarea genelor de diferenţiere. Astfel, acum apar diverse tipuri de celule.
Selecţia: Prin adăugarea unor produşi chimici, se distrug celulele nedorite şi se păstrează celulele dorite: în exemplu, neuroni şi celule pancreatice încă nemature.
Specializarea: Aceste celule diferenţiate, dar nemature, sunt puse într-un nou mediu de cultură specific unde pot să-şi urmeze specializarea.
Verificarea: După ce s-au obţinut celulele specializate, acestea sunt verificate în ceea ce priveşte „buna lor funcţionare", înainte de a fi utilizate în experimente (*ilustraţie preluată după Science et vie 1038, martie 2004*)

Scanned with OKEN Scanner

Rezultate, efecte

- Pornind de la „Embrionic Stem cells" (celule embrionare suşe) sau celule ES, pot fi create celule la dorinţă: ale pancreasului, ale ficatului, ale epidermei, pentru cartilaj, celule nervoase, cardiomiocite, fibre musculare etc.; de aici, un interes enorm.
- Celulele ES au o capacitate enormă de multiplicare fără a se diferenţia, deci pot fi menţinute în stadiul embrionar pe timp nedefinit.
- Problemele etice principale constau în păstrarea integrităţii embrionului ca entitate umană potenţială.
- În principiu, pot fi urmărite două piste, şi anume: folosirea celulelor adulte sau a celor embrionare; pentru a elimina problema de etică, se poate apela pentru aceasta la prima variantă, dar a doua este mai promiţătoare în privinţa mecanismelor genetice la nivel de celulă, ceea ce ar permite aflarea începuturilor vieţii.

Următoarele comentarii trebuie luate în considerare:

- Actualmente, se fac experimente prin grefarea de celule de origine fetală în diverse organe pentru regenerarea lor: un exemplu în acest sens este obţinerea de ţesut de inimă umană cu câteva zeci de mii de celule, dar pe o suprafaţă foarte mică, necesarul, în cazul unui atac cardiac putând ajunge de ordinul a miliarde de celule; deocamdată nu se ştie cum funcţionează acest procedeu ***in vivo***, dar se fac experimente pe porc şi şoareci pentru a se demonstra viabilitatea produselor.
- Un lucru greu de realizat este controlul asupra diferenţierii celulelor în cantitate şi calitate, cunoscut fiind faptul că pe lângă celulele utile, mai pot apărea şi altele, producătoare de tumori (o soluţie ar fi introducerea unor gene sau proteine care să inducă sinuciderea acestor celule);
- O altă problemă este legată de respingerea de către organism a noilor celule-ţesuturi. Aici se poate interveni însă prin plecarea de la celulele proprii ale pacientului, ceea ce garantează imunocompatibilitatea, trecând nucleii din celulele pacientului în ovocite denucleate, dând naştere la embrioni ce produc celule compatibile cu cele ale pacientului (clonaj terapeutic).
- Obţinerea de neuroni este un fapt împlinit deja, dar repararea unei leziuni nervoase reprezintă o problemă mult mai dificilă pentru că apar probleme legate de supravieţuirea neuronilor, de conectarea lor şi de devenirea lor funcţională, într-un sistem tridimensional.
- În aceşti ultimi ani se fac cercetări folosind celule ES pentru a detecta teratogenicitatea medicamentelor (efectul lor asupra dezvoltării embrionare); cu ajutorul celulelor ES se pot obţine modificări ale genelor în mod precis şi variat prin câştigarea unei funcţiuni, pierderea unei funcţiuni, substituire etc. prin introducerea în liniile celulelor ES a acelei gene mutante, răspunzătoare pentru o boală, exact în locul dorit.

În concepţia aceluiaşi Ian Wilmut, procedeul oferă posibilităţi nelimitate pentru tratamente medicale, altminteri irealizabile, mai ales când e vorba de organe defecte provocate de gene defecte. În acelaşi timp, celulele embrionale de bază menţinute în cultură ar putea, ca urmare a băncii de date a ţesuturilor care le reprezintă şi a unui

Scanned with OKEN Scanner

spectru mult mai larg de gene să servească la o mai bună testare a medicamentelor specifice. În loc să se mai facă teste pe animale sau oameni s-ar putea face pe aceste țesuturi rezultate din clonarea celulelor umane. Medicamentele astfel obținute ar trebui să combată numeroase boli cauzatoare de moarte. ■

3.3. DATE RECENTE PRIVIND ÎMBUNĂTĂȚIREA TEHNICILOR REPRODUCTIVE

Un nou model de înmulțire a animalelor a fost recent pus la punct de cercetătorii americani, și anume un fel de reproducere vegetativă. Experiențele au fost făcute pe șoareci și au constat în următoarele (fig. 172).

1) Este cunoscut că celulele embrionare, de pornire, de bază, pot fi manipulate prin diferite tehnici pentru a se obține celule și țesuturi specializate. Așa cum am văzut, această tehnică este folosită pentru terapia unor celule sau a unor țesuturi bolnave. Ea poate fi folosită și pentru clonarea animalelor sau chiar a oamenilor (fig. 172).
2) În mai 2003 un grup de cercetători, care nu s-au identificat însă, au propus ca din celulele embrionare ale șoarecelui să fie obținute chiar celule sexuale, folosindu-se tehnicile de inducere a unor gene corespunzătoare. În felul acesta lucrurile sunt oarecum inversate. Se poate afirma deci că se pot obține spermatozoizi sau chiar ovule artificiale (termen, firește, nepotrivit) și că acestea ar putea fi fecundate în vase de reacție urmând calea normală de evoluție până la blastocide, moment în care noul embrion (să-i zicem și lui artificial) poate fi implantat în uterul unei femele. Se va naște un animal cu totul nou, care nu are nimic genetic cu purtătoarea femelă.
3) Cercetătorii speră în felul acesta să realizeze celule spermale, în care pot fi induse gene de interes, prin care să se demonstreze eliminarea unor boli ereditare chiar înainte de fecundare.

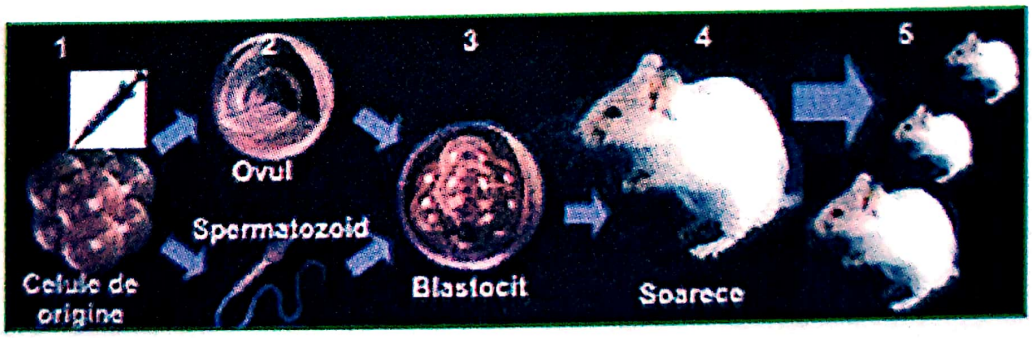


Fig. 172 – Obținerea artificială a celulelor sexuale la șoarece.
Se pleacă de la un embrion în prima fază de dezvoltare, la care, prin tehnicile de dirijare a formării celulelor și a țesuturilor, se induce formarea celulelor sexuale (artificial). Acestea se fecundează *in vitro* și se ajunge la un embrion artificial, care poate fi implantat în uterul unei femele pregătită în acest sens. Până acum s-au obținut numai spermatozoizi „artificiali". În curând vor fi obținute și ovule (*ilustrație după Focus 51/2003 pag. 15, modificat*)

Scanned with OKEN Scanner

3.4. POSIBILITĂȚI DE TRATARE A BOLILOR PARKINSON ȘI CHOREA HUNTINGTON

Boala Parkinson, așa cum se cunoaște, s-a dovedit netratabilă până în prezent. Pornind de la rezultatele obținute la animale, un grup de cercetători americani au încercat tratarea bolii prin folosirea celulelor nervoase ale unor blastocide (embrioni) în vârstă de câteva săptămâni. Folosind aceste produse - să le spunem biotehnologice - câteva sute de pacienți au fost în întregime vindecați.

Din punct de vedere tehnic, acest lucru a putut fi efectuat prin injectarea cu ajutorul unui ac lung și fin a celulelor nervoase foetale în creierul pacientului, mai exact în acea parte a creierului care produce dopamină și care la bolnavii de Parkinson se prezintă ca fiind depopulată de celule, adică este vidă. Celulele implantate se înmulțesc și ocupă cavitatea depopulată, produc dopamină în cantitate suficientă pentru a conduce la contractarea musculaturii și relansarea reziduală, lentă a capacității de mișcare.

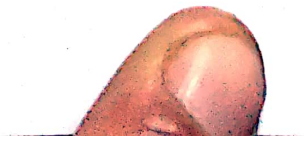
Testele clinice de implementare în practica medicală au fost efectuate de neurochirurgii Universității Denver din Colorado, pe 20 de pacienți, iar rezultatele au fost excelente.

Rezultate aproape asemănătoare s-au obținut și contra bolii Chorea Huntington. Cercetările franceze, efectuate sub conducerea neurochirurgului Marc Peschanski, au arătat că după două transplanturi cu celule foetale specifice zonei afectate a creierului care cauzează boala, cel puțin trei din cei cinci pacienți au părăsit scaunul cu rotile, au putut să se hrănească singuri și să meargă cu bicicleta, simptomele faciale au dispărut iar ei, pacienții, s-au integrat vieții normale.

Un al patrulea pacient, deși a reacționat mai întâi pozitiv la tratament, recuperându-și capacitățile de normalizare, la cinci luni după al doilea tratament, în zona din creier unde au fost injectate celule s-a dezvoltat un chist. Acesta însă s-a resorbit într-un timp scurt, dar totodată a dispărut și efectul terapeutic. La al cincilea pacient Huntington, întregul tratament nici n-a folosit, nici n-a dăunat.

O evoluție asemănătoare s-a înregistrat și în studiile efectuate de neurochirurgii americani sub conducerea lui Thomas Freeman (Universitatea din Florida de Sud). Din cei cinci pacienți cărora li s-au injectat celule foetale în creierul bolnav de Huntington, patru au evoluat normal, spre însănătoșire, iar unul singur a murit după 18 luni din cauza unui infarct care nu s-a dovedit a avea vreo legătură cu tratamentul.

Comentând moartea unor pacienți în experimentele mai sus prezentate, John D. Gearhart, profesor de ginecologie la o școală superioară de medicină din Baltimore, afirma: „Numai greșelile tehnice și încă insuficienta pregătire biotehnologică a personalului medical a condus la unele pierderi." Laboratoarele conduse de Gearhart dispun de o cantitate imensă de celule în cultură, într-o formă nediferențiată care pot fi în orice moment conduse spre dezvoltarea unor țesuturi organice necesare pacienților săi oricare ar fi aceștia (fig. 173). „Există și riscuri – spune Gearhart – există un pericol real ca celulele transplantate să producă cancer dacă selecția lor nu este perfectă". Tocmai de aceea se folosesc celule „de pornire" somatice sau sexuale, care nu



Scanned with OKEN Scanner

se înmulțesc necontrolat ci numai „specific" pentru funcțiile necesare, adică: nervi, inimă, creier, mușchi etc.

La început de drum riscul există și el depinde foarte mult de acuratețea tehnologiilor. Sunt încă multe detalii de pus la punct atât în ceea ce privește puritatea și specificitatea materialului genetic cu care se lucrează cât și a tehnologiilor și practicilor cu care se operează pe pacienți.

Chiar dacă ne repetăm, reafirmăm faptul că scopul terapeutic al clonelor este acela de a obține celule regenerative, care să dispună de același material genetic, dar sănătos, înlocuind pe cel defect, ca al pacientului însuși.

Adică am putea spune, mai puțin științific, că „reparația genetică" se face cu însăși materialul clientului. Celulele pot fi transplantate numai o singură dată, sau numai o perioadă de timp bine determinată.

În felul acesta, imunosistemul nu este afectat de transplant și se evită aplicarea dăunătoare a produselor imunodepresoare.

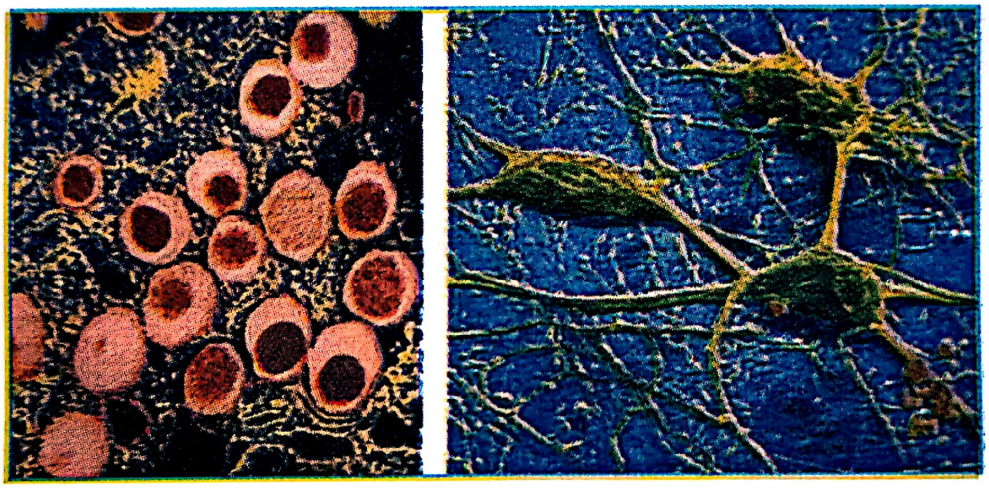


Fig. 173 – Celule sanguine (a) și celule nervoase (b) obținute din celulele primare - blastocite pregătite pentru a fi injectate pacienților care suferă de boli grave ale sângelui și creierului. Vezi și figura 172 (*fotografiile au fost publicate în revista Focus în diferite numere, 2002*)

3.5. ARN-UL INTERFERENT ȘI COMBATEREA UNOR BOLI INFECȚIOASE

3.5.1. Utilizarea bacteriofagilor

ARN-ul interferent (ARNi) reprezintă o tehnică genetică cu ajutorul căreia poate fi blocată manifestarea, exprimarea anumitor gene alese la animalele inferioare, inclusiv procariote. Pentru a se obține această blocare se folosesc molecule de ARN dublu elicoidale, de natură sintetică, care conțin secvența unei anumite gene care se suprapune acesteia pentru a-i bloca manifestarea prin blocarea ARN-mesager.

În același timp, s-a constatat că ARN-i există și în natură și este activ, fiind descoperit în 1995. Esența efectului acestuia constă în faptul că anumite gene rămân inhibate, inactive, neexpresive în mod natural.

Scanned with OKEN Scanner

REȚINEȚI!

Cercetările ulterioare au arătat că descifrarea acestui mister și reactivarea unor gene naturale extrem de utile ar putea oferi perspective terapeutice de-a dreptul revoluționare.

Misteriosul fenomen a devenit atât de interesant încât s-a decis constituirea unei adevărate rețele de cercetare în spațiul european și o strânsă colaborare cu cercetătorii de peste ocean.

Până la sfârșitul acestui an șase laboratoare din cinci țări europene au decis să-și unească eforturile pentru a studia fenomenul de interferență al ARN-ului. Echipa ce se va forma va fi finanțată de U.E. și are ca principal scop identificarea genelor implicate în acest mecanism „străin" important pentru apărarea celulelor a căror dezvoltare este punctată de paraziți celulari specifici (viruși, de ex.)

O parte din cercetări deja au demarat, la anumiți nematozi ai plantelor, asupra Drosophilei și la unele ciuperci, conform celor explicate de coordonatorul cercetărilor, Alain Bucheton, director de cercetare la CNRS în Montpellier. Cercetările urmăresc același lucru: realizarea unui studiu comparativ privind activitatea ARNi în toate aceste organisme.

Așa cum s-a arătat mai sus, fenomenul a fost descoperit întâmplător în anii '90 la petunii, urmare a unei manipulări genetice.

Concret, interferența prin ARN (sau activitatea ARNi) nu este altceva decât un mecanism destinat să împiedice funcționarea acelei **mașinării celulare** care produce proteinele. În toate celulele mediului viu, planurile de fabricare a acestor proteine sunt înscrise sub formă de gene în patrimoniul genetic al organismului. La eucariote, adică la toate organismele în afara bacteriilor, acest patrimoniu este situat în nucleul celulei, înscris în ADN. Pentru a putea fi elaborate proteinele, ADN-ul trebuie plasat cu precizie în afara „coconului" său protector, adică a nucleului. Aceasta înseamnă că celula trebuie să realizeze o copie a fiecărei gene, copia aceasta este ARN-ul mesager (despre care s-a vorbit mult în această lucrare), care este alcătuit dintr-un singur fir (bandă) și el transmite informația ADN-ului către ribozomi, adică către fabricile de proteine ale celulelor (fig. 174, sus dreapta).

Studiile efectuate pe specia ***Caenorhabditis elegans***, în 1995, de către echipa americană condusă de Anrew Fire și Craig Mello au dus la constatarea că fabricarea proteinelor poate fi scurtcircuitată. Pentru aceasta este suficientă introducerea în celulă a unui ARN, de această dată sub formă de fir dublu, adică ARNi. Acesta, o dată injectat în celulă este tăiat în mici bucățele de către o enzimă denumită Dicer (fig. 174, stânga jos). Fiecare mic segment este apoi încorporat într-un complex de molecule, nu în întregime cunoscute, dar așezate în așa fel că cele două benzi ARN-ice se găsesc „expuse" către exterior.

Atunci când una dintre cele două benzi întâlnesc (interferează) un ARNm mesager (stânga, jos în nucleu) care îi seamănă în întregime, acesta din urmă se suprapune până la cuplare peste cel din baza de expunere și dispare, este deci distrus (vezi celula, dreapta, jos). Pentru celulă este, în consecință, distrus mecanismul de producere a proteinelor

Scanned with OKEN Scanner

care venea prin ARNm. Gena este deci redusă la tăcere. Această interferență de către ARN sau prin ARN a provocat o „adevărată emoție", dublată de admirație în breasla biologilor, tocmai pentru faptul că mecanismul se regăsește în natură: ultimile cercetări au demonstrat, de fapt, că toate eucariotele de la ciuperci și plante la animale și om sunt capabile de a produce ARN-ul interferent și de a-l utiliza pentru a-și regla activitatea celulară. Or, reglarea activității celulare prin inhibarea sau activarea genelor responsabile de producerea anumitor molecule poate fi tocmai expresia potențialului său terapeutic care trezește un foarte mare interes pentru laboratoarele de cercetări publice.

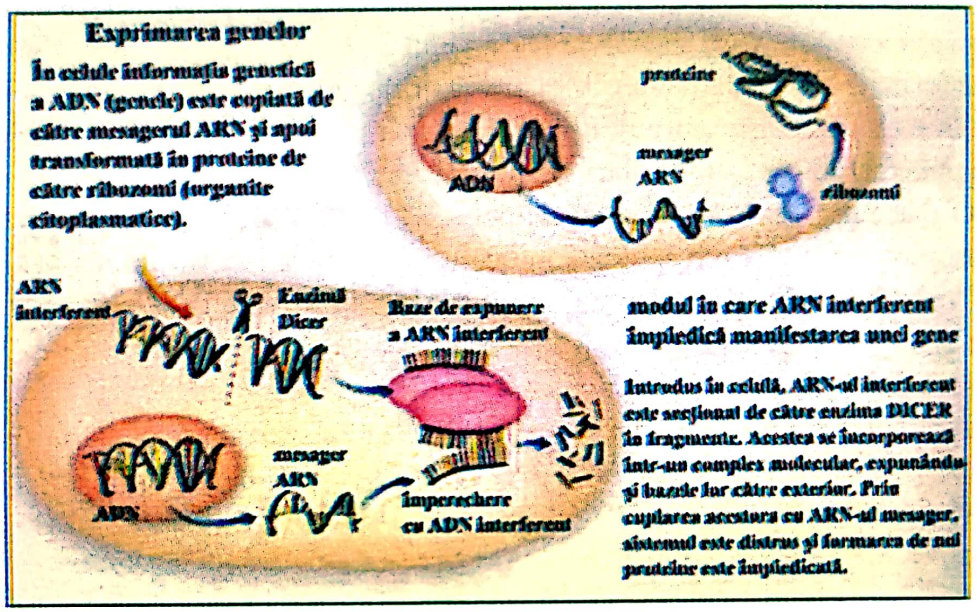


Fig. 174 – Modul de exprimare normală a genelor (dreapta, sus) precum și modul de lucru al ARN interferent - ARNi (stânga, jos)

3.5.2. Teoretic se poate combate și SIDA

Dacă stăm să judecăm bine, activitatea ARNi poate fi considerată ca un mijloc ancestral de luptă contra agenților patogeni, și în primul rând a virușilor care, în interiorul celulei, infectează propriile ei proteine.

În luna iulie a anului 2002, cercetătorii anglo-saxoni au constatat că fenomenul mai sus prezentat este capabil să contracareze virusul poliomielitei și al SIDA în culturile de celule umane. Această premieră nu trebuie însă să ne facă să uităm obstacolele care barează încă drumul spre aplicațiile terapeutice.

Aceasta ar fi:

- virușii care ar putea să reziste tratamentelor prin modificarea patrimoniului lor genetic;
- schimbări genetice care ar putea în egală măsură să împiedice ARN-ul interferent să-și recunoască ARN-ul său mesager și deci să permită reproducerea virușilor;
- va trebui găsită o modalitate, un mijloc de a livra ARN-ul interferent (creat artificial în laboratoare speciale pentru un virus specific), exact pentru celulele care au nevoie de el (celule canceroase, de ex.)

Scanned with OKEN Scanner

La această delicată problemă lucrează acum foarte numeroase laboratoare din lume pentru că este necesară o mult mai bună aprofundare a mecanismului în sine.

Acest lucru îl fac în momentul de față și cele șase laboratoare europene care promit că în curând SIDA și cancerul vor beneficia de tratamente foarte eficiente.

Foarte recent, și anume în februarie 2004, revista Science et Vie, sub titlul „Misterul rezistenței la SIDA este elucidat", prezenta faptul că există populații umane rezistente la infecția cu HIV. Se cunoștea deja faptul că există mutații genetice capabile de a proteja infecția, dar nu se cunoștea această nouă formă de rezistență. Fenomenul a fost descoperit de o echipă a Institutului Pasteur din Paris condusă de Daniel Scott-Algara în colaborare cu medicii spitalului din capitala Ho Shi Min. Aceștia au analizat o populație umană de 40 de vietnamezi care, deși infectați cu virusul HIV de cel puțin 2 ani, ei rezistă la infecție fără a manifesta vreun sindrom de îmbolnăvire.

Secretul rezistenței lor îl constituie unele celule ale sistemului lor imunitar denumite „ucigași naturali" - natural killers (NK) (vezi fig. 175).

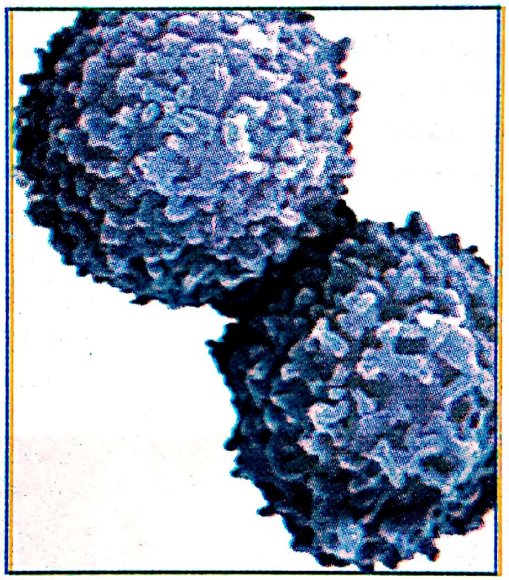


Fig. 175 – Celule NK - ucigași ai virusului HIV.
Aceste celule prezente în sistemul imunitar uman ar putea apăra eficient indivizii împotriva manifestărilor bolii SIDA

Celulele NK sunt prezente la toți indivizii umani. Unele populații, cum sunt și cei 40 de vietnamezi dispun de celule NK mult mai active modificate genetic, care secretă o cantitate foarte mare de cytokine (cytokinone), substanțe care blochează accesul HIV-1 în celulele organismului. Spre deosebire de ANRI, care omoară virusul HIV-1 o dată intrat în celulă, dar înainte de a face rele, celulele NKa (activate) distrug HIV-1 înainte de a intra în celulele somatice. Această descoperire permite precizarea profilului persoanelor rezistente, a identificării lor, dar și a celor mai sensibile, mai fragile, ceea ce ar conduce mult mai ușor la controlul acestei periculoase boli sociale. Următorul pas ar fi acela al descoperirii secvenței proteice care imprimă activitatea de producere excesivă a cytokinelor și transferul ei către sistemele imunologice ale persoanelor sensibile. Operațiunea este însă îndelungată, dificilă și nu lipsită de riscuri. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.5.3. În curând viruşii vor înlocui antibioticele

S-a constatat deja că în lupta cu maladiile infecţioase antibioticele sunt din ce în ce mai puţin eficace şi din acest motiv revenirea pe planetă a marilor epidemii ar putea deveni curând posibilă. Antibioticele au devenit deci rezistente şi trebuie neapărat găsită o altă soluţie, adică un alt fel de tratament împotriva bacteriilor infecţioase.

Cercetări foarte vechi, dar şi mai noi au demonstrat deja că virusurile sunt şi pot fi în continuare cei mai mari inamici ai bacteriilor. Ecologic vorbind, relaţiile dintre virusuri şi bacterii sunt acelea dintre pradă şi prădător, fenomenul derulându-se în zona micro, până la limita apariţiei eucariotelor.

„Ideea utilizării fagilor pentru tratarea infecţiilor bacteriene este veche de 90 de ani", precizează Camille Locht, microbiolog şi director cu cercetarea al Institutului Pasteur din Lille. O dată cu apariţia antibioticelor, însă, prin anii '40, această pistă de cercetare, de studiu, a fost practic abandonată. Reexplorarea acestei noi biotehnologii a început recent, o dată cu apariţia unei veritabile flore de microbi, rezistenţi la antibioticele cele mai eficace. Utilizarea abuzivă şi permanentă a acestora, uneori pentru a rezolva chiar şi infecţii minore, a permis bacteriilor să devină din ce în ce mai insensibile. Rezistenţa la antibiotice a fost indusă bacteriilor prin mici modificări în materialul lor genetic, permiţându-le să tolereze concentraţii din ce în ce mai mari în tratamentele efectuate.

În luna iulie 2002 a fost descoperită o sursă a *Stafilococului auriu*, rezistentă la Vancomycină, unul din ultimile produse eficace până în prezent împotriva acestei bacterii, cu care românii s-au confruntat frecvent prin spitalele ţării de mai mulţi ani, mulţi găsindu-şi moartea din cauza acestuia.

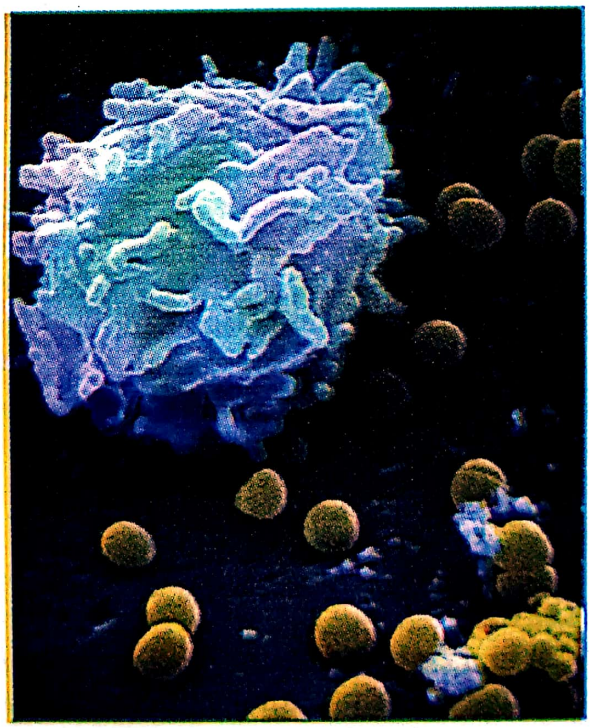


Fig. 176 – Suşe ale stafilococului auriu *(Staphylococus aureus)* rezistentă la Vancomycină (jos, galben).

Scanned with OKEN Scanner

Apariţia rezistenţei la antibiotice nu este deloc un fenomen nou. Deja în 1947 s-a identificat o suşă de stafilococ, rezistent la penicilină, în chiar primul an de comercializare a acesteia. Începând cu debutul anilor '90, rezistenţa a devenit deja o problemă alarmantă. Din nefericire, eforturile intensive ale industriei farmaceutice nu au putut descoperi şi promova nici o clasă de noi antibiotice în aceşti ultimi ani. ■

3.5.3.1. Este necesară găsirea unei noi piste

Reapariţia bolilor infecţioase din era pre-antibioticelor este oricând posibilă. În consecinţă, este necesar ca, în regim de urgenţă, să fie produse noi tratamente. A reapărut deci un interes imens pentru virusurile bacteriofage. Cercetările au fost preluate de această dată de o multitudine de companii private, printre care enumerăm: Phage Therapeutics International Inc. (America), Biophage Inc. din Montreal (Canada), Ganga Gen (India); Phage Biotech (Israel) şi altele. „Avem un virus specific care prezintă un real potenţial terapeutic" afirmă Kishore Murthy, director ştiinţific la Ganga Gen. S-au descoperit, de asemenea, mai mulţi fagi capabili să ucidă suşele unor stafilococi şi streptococi şi alte bacterii responsabile de infecţii cutanate şi rezistente la un număr foarte mare de antibiotice.

Laboratoarele publice au început şi ele să se lanseze puţin câte puţin în această cursă. Unul dintre ultimile, ca iniţiativă care a făcut acest pas, este Institutul Pasteur din Lille, recunoscut pe plan mondial pentru cercetările sale asupra tuberculozei. În acest sens s-a iniţiat o colaborare cu firma Regma şi s-a format o echipă, condusă de tânărul cercetător Pablo Bifari, căruia i s-a acordat o încredere totală. Tema proiectului „Elaborarea unui tratament fagic contra tuberculozei" a spus Camilla Locht.

Tuberculoza a fost şi rămâne o boală foarte periculoasă, produsă de bacteria *Mycobacteria tuberculosis*. Conform estimărilor O.M.S. (Organizaţia Mondială a Sănătăţii) boala în cauză omoară în continuare anual 2 milioane de persoane. 1/3 din populaţia globului este infectată cu teribila bacterie şi 5-10% dezvoltă tuberculoza în timpul vieţii lor, într-un moment în care sistemul imunologic se slăbeşte fie din cauza unei boli grave, fie din cauza mizeriei sau bătrâneţii. Toate acestea se întâmplă pentru că ***Mycobacterium tuberculosis*** supravieţuieşte chiar în interiorul celulelor sistemului imunitar (sistemul macrofag). Aşa ascunsă, ea scapă sistemului nostru de apărare, aşteaptă slăbirea acestuia, uneori suficient de mulţi ani înainte de a se înmulţi şi de a ne readuce boala sau bolile. Tratamentul efectuat astăzi cu antibiotice devine din ce în ce mai puţin eficient şi prezintă şi alte inconveniente:

a) „...este prea lung, între 4 şi 2 ani", explică Pablo Bifani;
b) este prea dificil, căci are nevoie de antibiotice; izoniazide, rimfampicine, pyrizinamide şi streptomicine sau ethambutol;
c) aşa cum s-a precizat, există suşe de ***mycobacterium tuberculosis*** rezistente la toate aceste antibiotice. ■

3.5.3.2. Un nou tratament pe bază de fagi (spray cu fagi)

Pentru a pune la punct un nou medicament, microbiologii au identificat în mediu fagi, capabili să omoare **bacteriile tuberculozei**. După aceea, cu ajutorul tehnicilor genetice, ei le modifică, bineînţeles genetic, pentru a le induce mai multă virulenţă. Pe

Scanned with OKEN Scanner

termen scurt, obiectivul acestor „viruşi îmbunătăţiţi genetic" ajunşi într-un spray, este acela de a reduce capacitatea de diseminare a bacteriei.

Un individ infectat devine foarte contagios fiindcă deţine în căile sale respiratorii superioare o mare cantitate de bacterii. Aşadar, în prima fază, administrarea virusului trebuie să limiteze contagiozitatea (contaminarea).

Pe termen lung însă acelaşi Pablo Bifani speră să producă un medicament care s-o omoare pe ***Mycobacterium tuberculosis*** direct la locul de infecţie, adică în plămâni. Bifani este însă conştient de faptul că drumul spre un medicament complet este foarte lung. Pe cât de simple par lucrurile însă în plan teoretic, pe atât de dificile sunt în plan practic, pentru că:

1) Fagii sunt foarte selectivi. Un anumit tip de virus nu recunoaşte şi nu omoară decât o singură suşă a bacteriei. Or, o infecţie este adesea rezultatul contaminatoriu cu mai multe suşe. De aceea, tratamentul trebuie să aibă în componenţă o multitudine de virusuri bacteriofagi, iar cercetătorii să deţină o adevărată bancă de date despre aceştia.
2) Chiar dacă agenţii infecţioşi sunt mai puţin susceptibili de a deveni rezistenţi la virusuri comparativ cu antibioticele, riscul totuşi există, nu este deloc nul.
3) A face bine cu ceva rău (virusurile sunt considerate agenţi foarte periculoşi şi pentru oameni, nu numai pentru bacterii) nu este deloc lipsit de risc. Există suficienţi cercetători care cred că administrarea unor doze mari de virusuri provoacă o reacţie imunitară importantă.

Pablo Bifani afirmă totuşi că „cercetătorii lucrează pentru a găsi soluţii la fiecare dintre aceste probleme". Pentru a realiza o eficacitate sigură, cele câteva firme implicate în cercetări şi-au propus să treacă la prepararea coctailurilor cu amestecuri din mai multe tipuri de virusuri care să recunoască şi să distrugă mai multe suşe ale bacteriei sau să fie orientaţi către o singură bacterie, oferind garanţia că aceasta nu va crea forme rezistente.

Din figura 177 rezultă clar că, dacă bacteria se adaptează la un fag (culoarea verde) modificându-şi structura receptorului său, alţi fagi sunt în permanenţă prezenţi pentru a infecta bacteria, a se înmulţi (2 din figura 177) şi a o distruge (3 din figura 177). ■

3.5.3.3. O altă alternativă - aceea a proteinelor ucigaşe

În varianta anterioară s-au luat în considerare virusuri mutante, adică genetic modificate, pentru a putea fi recunoscute mai multe supe de bacterii cu capacitate mare de infectare. Ideea acestei variaţii alternative este de a identifica genele virulente ale mai multor fagi şi de a le reeşalona într-unul singur. Cu alte cuvinte, nu se mai foloseşte întregul virus, ci numai acea secvenţă proteică care îi codifică virulenţa.

Schema biotehnologică a acestui procedeu este prezentată în figura 178. Coctailul va fi deci alcătuit nu din virusuri, ci din proteinele bacteriofage foarte eficiente, cu alte cuvinte partea neutilă a virusului este eliminată, trimisă la plimbare.

Scanned with OKEN Scanner

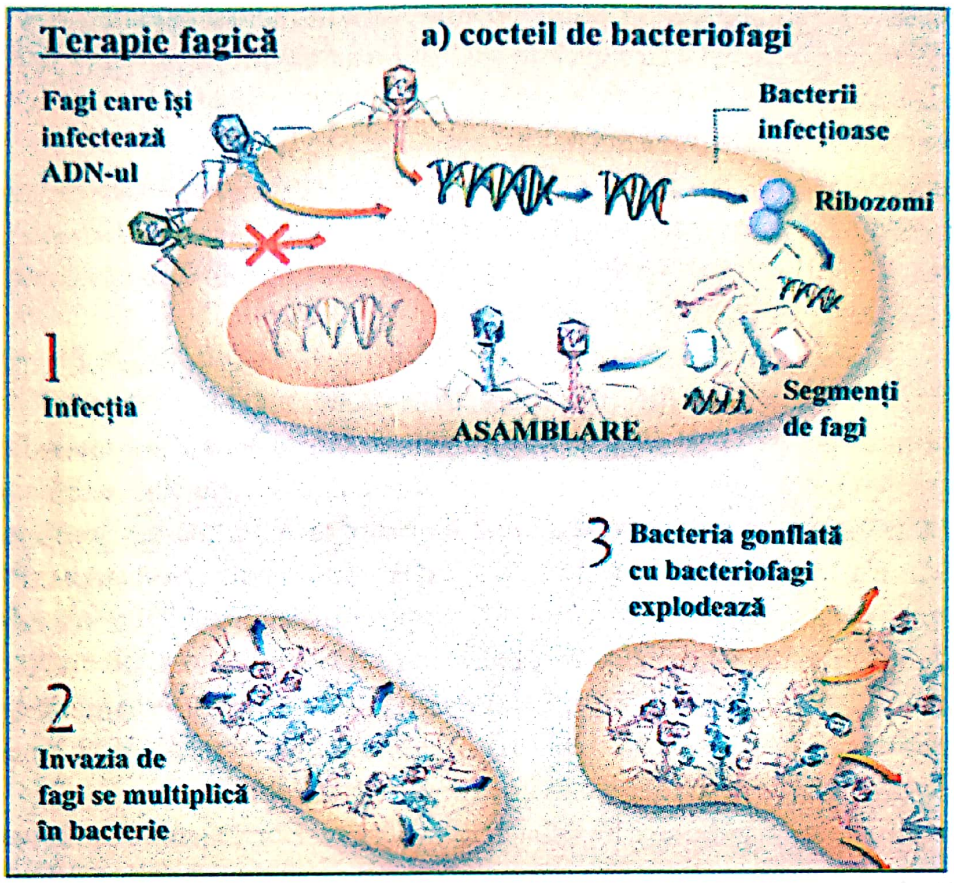


Fig. 177– Terapie fagică de viruși bacteriofagi.

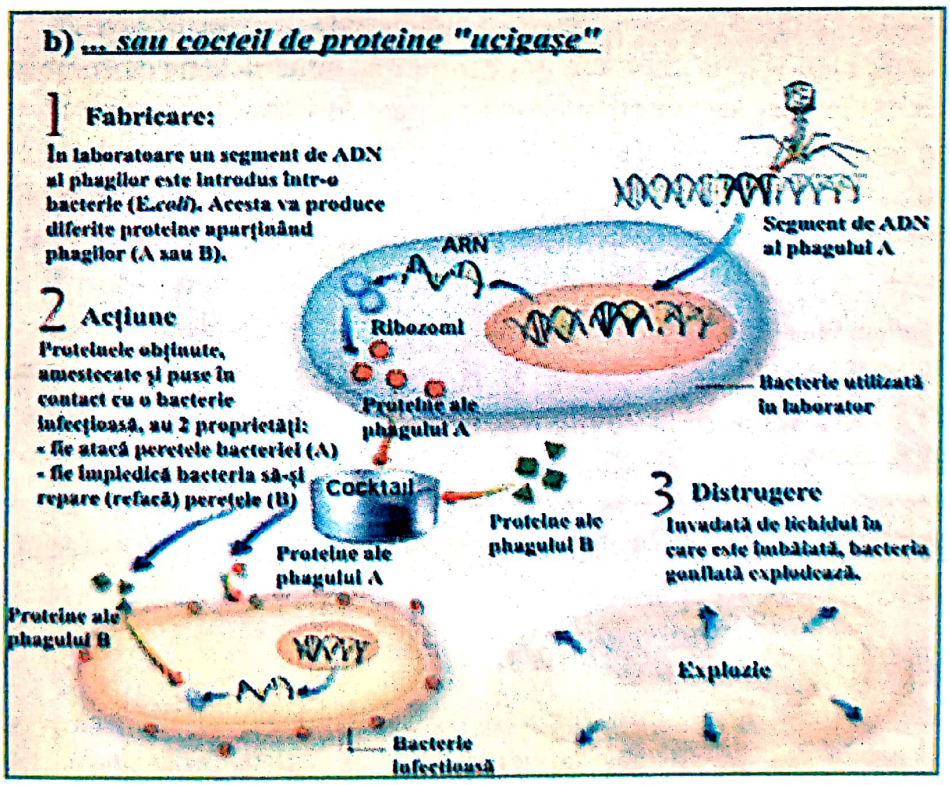


Fig. 178 – Terapie fagică pe bază de proteine ucigașe.
Prin perforarea pereților bacterieni, lichidul pătrunde în celulă, care se umflă și explodează

Scanned with OKEN Scanner

Avantajul acestui procedeu, conform sudiilor a numeroşi cercetători, printre care şi microbiologul Vincent Fiscchetti de la Universitatea din New York, constă îndeosebi în „scurtciruitarea reacţiei imunitare la virusuri" a organismului care primeşte tratamentul. Cu alte cuvinte, pistele nu lipsesc.

„Cred că actualele noastre cunoştinţe de fiziologice şi biologie moleculară a fagilor ne vor permite să punem la punct medicamente eficace", afirmă Carl Meril, director cu cercetarea la Institutul Naţional American al Sănătăţii. El este acela care a făcut o experienţă interesantă la şobolani, şi anume:

- a contaminat animalele cu o bacterie rezistentă la Vancomycină şi anume ***Enterococus faecium***, cărora le-a inoculat apoi cu fagi.

Rezultatul a fost acela că toate animalele au rezistat, au supravieţuit infecţiei. Firește că se gândeşte acum la verificarea eficacităţii virusurilor asupra oamenilor. Pablo Bifani speră să lanseze efectuarea primelor teste chimice privind noile tratamente contra tuberculozei la om la sfârşitul anului viitor. „Ne aşteptăm deci ca în cursul anului 2005 noile „medicamente" pe bază de bacteriofagi contra tuberculozei, un fel de vaccinuri, să apară deja pe piaţă".

Omul este pus în capul lucrurilor şi pentru a-şi cumpăra un segment suplimentar de viaţă va plăti primul aceste realizări biotehnologice. Va reveni la rând protecţia împotriva altor boli infecţioase, atât la animale cât şi la plante.

Gândiţi-vă câte pagube face focul bacterian al rozaceelor, ***Erwimia amilovora***, la plantaţiile de meri şi gutui ale ţării. Un singur tratament cu un coctail de fagi specifici ar putea rezolva problema. Bazele teoretice există, implementarea lor în practică este o chestiune de timp pentru acele ţări care acordă cercetării importanţa şi respectul cuvenit.

Aş atrage atenţie cititorilor avizaţi că între cele două sisteme de combatere a unor boli, ARNi şi bacteriofagi există unele asemănări de sistem, şi anume:

- în amândouă cazurile, fenomenele se întâmplă la nivelul celulelor;
- în primul caz, distrugerea celulei bolnave (SIDA, cancer, poliomielită etc.) are loc prin distrugerea proteinelor care-i menţin viaţa, în timp ce în al doilea caz, ea explodează datorită înmulţirii fagilor care, în ultimă instanţă, tot proteine sunt. Comun este faptul că este distrus echilibrul celulei;
- în amândouă cazurile intră în joc ameliorarea genelor, fie pentru a le face active, fie pentru a le îmbunătăţi informaţia privind dezvoltarea unor însuşiri prea puţin active. ■

3.6 OBŢINEREA DE PRODUSE FARMACEUTICE BIOTEHNOLOGICE PENTRU NUMEROASE ALTE BOLI

3.6.1. Medicamente de mare interes

S-a demonstrat deja că prin tehnologii genetice pot fi cu uşurinţă produse unele substanţe complexe greu de găsit în natură, cum ar fi unele proteine speciale. În practică, o proteină dorită, de interes, poate fi obţinută tot cu ajutorul microorganismelor, cu condiţia ca o genă ce codează proteina respectivă să fie transferată cu ajutorul unuia

Scanned with OKEN Scanner

din vectorii de-acum cunoscuți în: bacterii, hefe (ciuperci de bere) sau alte celule care pot crește bine pe medii de cultură.

Prin tehnologii genetice promotori de înaltă activitate (sau alte elemente de control) sunt înglobate în ADN-ul vector și prin aceasta se realizează „o exprimare a vectorului" care transferată celulei gazdă este în măsură să sintetizeze cantități mari ale produsului codat genetic și indus vectorului. Mai mult încă, celulele gazdă pot în așa măsură să fie modificate genetic încât o proteină după fabricare să fie separată, cernută. Acest lucru simplifică enorm purificarea atât de necesară pentru proteinele obținute prin procedee biochimice tradiționale.

- O aplicare practică a acestui procedeu este trecerea la fabricarea cu ajutorul bacteriilor a unor hormoni care se extrăgeau din organele unor mamifere. În acest sens, sunt nominalizate trei produse de mare importanță, și anume:
  - Insulina, care reglează metabolismul zahărului în organism.

  Avantajul fabricării insulinei prin biotehnologii constă în faptul că ea se obține cu ajutorul unor gene identice celor umane, secvențele nucleotidice putând a fi recoltate de la oameni și transferate apoi bacteriilor care fabrică o insulină compatibilă mult superioară calității celei obținute din porc și vită.
  - **H.G.H.** (human growth hormon), adică un hormon de creștere foarte eficace ce se aplică mai ales copiilor cu deficiențe hormonale și care evită dezvoltarea „pitică" a omului.
  - **T.P.A.** (tissue plaminogen activator) - adică un activator plasminogen al țesuturilor: proteina fabricată, de asemenea, în laboratoare participă activ la dizolvarea cheagurilor de sânge și reduce semnificativ riscul apariției unor infarcte, altminteri inevitabile. Aceasta pentru că proteina în cauză se aplică după primul infarct și le evită pe cele care ar trebui să le succeadă. T.P.A. clarifică însă o problemă care apare la numeroase produse genetice și anume aceea a costurilor enorme de dezvoltare și a unui segment de piață redus, ceea ce le face să fie foarte scumpe. Putem afirma că produsele medicamentoase de origine biotehnologică nu sunt nici pentru țări sărace și nici pentru oameni săraci, neasigurați.

Putem de asemenea afirma, conform celor spuse de Gibbs Wayt (Scientific American 8), că proteinele sunt „caii de povară ai biochimiei" pentru că ele sunt implicate în toate procesele biochimice ale organismului. Biotehnologiile genetice după ce s-au ocupat de celule, ADN, gene etc., aleargă acum după descoperirea unor proteine cât mai eficace. Aceasta înseamnă că ele trebuie să fie cât mai pure și în cantitate suficientă. Or, acest lucru este greu de realizat în practică. Ca urmare, proteinele farmaceutice sunt mai scumpe decât aurul.

Omalizumab (Xolair - nume comercial) este un anticorp modificat genetic care este în curs de omologare, pentru combaterea astmului. Un tratament cu acest produs va costa circa 10.000 USD/an, adică de 10 ori mai scump decât actualele medicamente. Obținerea unor proteine mai ieftine de origine medicală se poate realiza prin obținerea lor genetică în bioreactoare vii (păsări, animale, pești) sau prin inducerea

Scanned with OKEN Scanner

genelor în unele specii de ciuperci cum ar fi *Pichia pastoris*, găsită în scoarța copacilor care poate produce o proteină glicolizată umană extrem de importantă. În felul acesta se înlocuiesc celulele animaliere greu de controlat cu cele ale ciupercilor mult mai flexibile din punct de vedere tehnologic.

Printre realizările importante în domeniul obținerii de medicamente obținute prin procedee biotehnologice de tip transformări genetice se numără și obținerea dar și omologarea produsului **Leuproghel**, un produs destinat a combate cancerul de prostată. Este primul medicament obținut de o firmă biotech în Germania, iar firma se numește MEDIGENE și are sediul în Martinsried, lângă München. Germania este cunoscută pentru rezistența opusă până în prezent folosirii chiar și în medicină a produselor modificate genetic. Acest prim succes a animat spiritele în Germania, alte 30 de medicamente fiind acum analizate în vederea omologării. Informația vine de la Horst Damdey, directorul Centrului de Inovație și Cercetare de bază în Biotehnologii, cu sediul în München. Există șanse mari ca aceste produse să fie omologate în următorii 4-5 ani, Germania devenind un concurent puternic pe piața produselor transformate genetic destinate terapiilor umane (Süd Deutsche Zeitung 46/285, 19 dec. 2003). ■

3.6.2. Puncte de vedere evolutive privind controlul virusului HIV

După mai bine de 15 ani de cercetări asidue, specialiștii în virusologie și alte boli infecțioase au ajuns la concluzia că SIDA nu se poate vindeca. Boală socială de mare gravitate, SIDA provoacă mari probleme legate de psihoza, comportamentul și costurile populațiilor umane în care apare masiv. SIDA, boală modernă, a înlocuit „ciuma" (boală bacteriană de ev mediu) căci, a spune că ești bolnav de SIDA azi este echivalent cu a spune că ești bolnav de ciumă (de pe vremea când această boală era necontrolată).

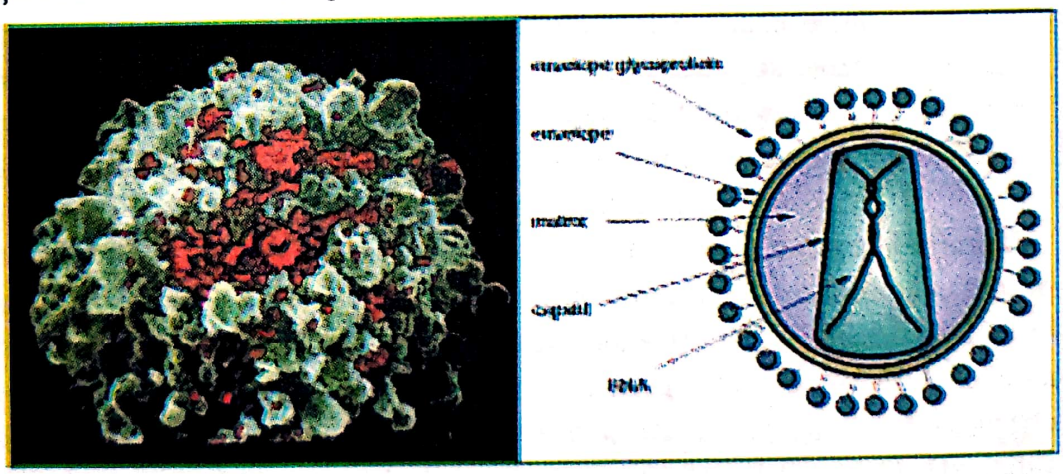


Fig. 179 – Virusul HIV.
a) Este ascuns în sistemul nostru imunitar de unde este transferat în celulele organismului.
b) Este un retrovirus cu dimensiuni de 80-100 nanometri, extrem de agresiv și rezistent, creat ca toate virusurile numai din ARM.

Pe la mijlocul anilor '90, savanții au realizat deja dificultatea eradicării virusului HIV din organismul uman și au trecut imediat la găsirea unor soluții care să facă boala

Scanned with OKEN Scanner

mai suportabilă pentru bolnavi şi să reducă numărul cazurilor de mortalitate. S-a aplicat principiul: „dacă boala nu poate fi combătută, atunci e foarte bine dacă bolnavul trăieşte alături sau împreună cu ea. A fost şi este încă o soluţie de compromis foarte scumpă şi care se poate aplica numai ţărilor bogate, cu un solid sistem de protecţie şi asistenţă socială, unde a şi condus la reducerea de 5-6 ori a bolnavilor de SIDA.

a) Iniţial a apărut aşa-numitul program de „asociaţii de diverse medicamente contra infectării cu HIV denumit multiterapii" care au creat un entuziasm în lumea medicilor, dar nu şi a biologilor şi care după numai 6 ani de zile a condus la concluzia că „virusul din organism nu mai poate fi scos după ce el a reuşit să infecteze celulele". Medicii şi-au propus atunci o altă tactică şi anume aceea de „a-i reduce proliferarea" în vederea prelungirii vieţii pacienţilor. De la început trebuie să precizăm faptul că „produsele multiterapii" provoacă efecte secundare neaşteptate atât prin frecvenţa cât şi prin intensitatea lor" conform afirmaţiilor profesorului Jean-Francors de la spitalul Bicetre - Paris (Science et vie, decembrie 2002 p. 120).

b) Produsele medicamentoase omologate astăzi pentru ajutorarea bolnavilor de HIV numără 15 substanţe denumite „antivirale", comercializate. Termenul antiviral nu este tocmai potrivit. El aparţine la două familii foarte mari.

b1. Inhibitori ai transcriptazei inverse. Prin transcriptază se înţelege acea enzimă care iniţiază procesul de transcripţie, adică de creare a matriţei ARN care să conducă în afara nucleului informaţia cu pricina în ADN-ul corespunzător. Transcriptaza inversă este o enzimă virală care iniţiază un proces invers şi anume acela de a transforma ARN-ul în ADN, iar în cazul ARN-ului viral acesta participă efectiv la transferul materialului genetic viral în genomul uman unde este conservat sub forma unui provirus într-un cromozom. Medicamentele în cauză blocând formarea transcriptazei inverse vor bloca şi transferul ARN-ului viral în genomul uman, adică va fi limitată proliferarea virusului (fig. 180).

b1.1. Inhibitorii de tip analogi nucleozidici precum A.Z.T. 3 T.C. d4T, d.d.1 şi ddc. Subliniem aici spre aducere aminte că nucleozidele sunt precursori ai nucleotidelor, adică ai cărămizilor de bază ale vieţii (adenina, guanina, cytozina, tymina), adică a acelor molecule care folosesc pentru construirea ADN-ului sau a ARN-ului. Pentru efectuarea operaţiunii de retro-transcripţie, transcriptaza inversă se deplasează de-a lungul ARN-ului viral, citeşte informaţiile înscrise acolo şi asamblează nucleotidele corespunzătoare. Făcând parte din nucleotide, nucleozidele analoage sunt şi ele inserate în acest lanţ. Dacă se aplică pacientului inhibitor de transcriptază inversă (sub forma unui medicament), chiar dacă se află pe locul ei, aceasta se arată incapabilă de a continua alungirea ADN-ului viral (provirusul). În consecinţă, virusul nu va pătrunde în nucleu şi nu va fi transmis prin înmulţirea celulelor în întreg organismul.

b1.2. Inhibitori non-nucleozidici precum: efavirenz, nevirapina, delavirdina etc., acţionează direct asupra enzimei, lipindu-se de ea, reuşind să o deformeze şi împiedicând-o să citească ARN-ul viral.

Scanned with OKEN Scanner

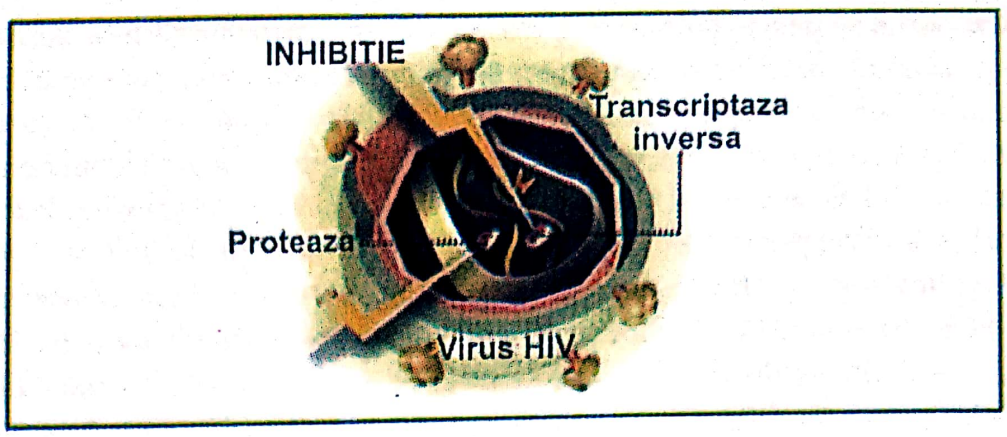


Fig. 180 – Modul de acţiune al inhibitorilor transcriptazei inverse.
Inhibitorii transcriptazei inverse (medicamente de tip A2T, 3TC dnT etc.) împiedică deplasarea enzimei de-a lungul ARN-ului viral şi ca urmare împiedică formarea provirusului HIV şi implementarea lui în genomul uman (*Science et vie dec. 2002, p. 133*)

b2. Inhibitorii proteazei enzimă despre care s-a vorbit mult în acest material acţionează la afârşitul ciclului de replicare al HIV-ului (vezi figura 112, capitolul 3.5). Proteaza este enzima care permite fabricarea tuturor proteinelor din ARN-ul viral, pornindu-se de la mari precursori proteici (polipeptide). Inhibitorii enzimei care se găsesc în diferite medicamente precum: Saquinavir, Ritonavir, Indonavir etc.) se fixează de ea, îi schimbă forma şi îi interzic să-şi exercite funcţia. Vironii formaţi deja rămân imaturi adică nefuncţionabili şi nu mai sunt în măsură să infecteze noi celule (fig. 181). Am putea spune că inhibitorii proteazei constituie a doua generaţie de medicamente pentru controlul virusului HIV care au început a fi comercializate după 1996, cu o eficacitate mai mare de 100-1000 de ori prin comparaţie cu a inhibitorilor transcriptazei reverse aduşi pe piaţă încă de la începutul anilor '80.

c) Antiviralele gen anti-HIV sunt însă în egală măsură produse care stau la originea a foarte numeroase complicaţii (efecte secundare) cum ar fi:

c1. Lipodistrofiile, foarte greu suportate de bolnavi pentru că produc anomalii ce schimbă fenotipul bolnavilor, aceştia ajungând uneori în situaţia de a nu se mai recunoaşte ei înşişi, datorită unei repartiţii distrofice a grăsimilor. Atingând direct imaginea bolnavului, acesta începe să refuze tratamentul, intervenţiile chirurgicale reparatorii fiind uneori practice, dar dificile.

c2. Perturbări ale metabolismului glucidelor şi lipidelor după pătrunderea lor în celule. După 2 ani de tratament, 70% din bolnavi prezintă aceste tulburări metabolice: tot aici intră şi alte tulburări cum ar fi toleranţa la glucoză, secreţie prea mare de insulină, diabet, creştere a grăsimilor din sânge (colesterol şi trigliceride), efecte secundare ce reprezintă adevăraţi factori de risc ai maladiilor cardiovasculare.

c3. Tulburări ale mitocondriilor care sunt centralele energetice ale celulelor şi care se manifestă prin dureri musculare, dereglări neurologice sau digestive ca şi ale oaselor (osteoporoză).

Scanned with OKEN Scanner

d) **Noi soluţii.**

d1. Se studiază introducerea pauzelor terapeutice, adică întreruperea pentru un timp a tratamentului pentru a permite un aşa-zis moment de respiro organismului. Aceste întreruperi par a nu fi periculoase, deoarece limfocitele CD4 reîncep să scadă, dar numai după un anumit timp.

d2. Căutarea unor noi tratamente mai puţin toxice, adică utilizarea unor noi molecule „vitale" în special pentru acea categorie de pacienţi la care multiterapiile actuale nu reuşesc să reducă încărcătura virală. Unul dintre aceste noi produse este molecula T20, care face parte din ultima generaţie de molecule anti-HIV, din categoria inhibitori de intrare (fig. 181).

Aceşti inhibitori împiedică virusul să invadeze celula. Fixându-se pe proteina g.p41, T2a se agaţă ca un cârlig, realizând o fuzionare a membranei sale cu cea a celulei HIV, blocându-i pătrunderea în celule.

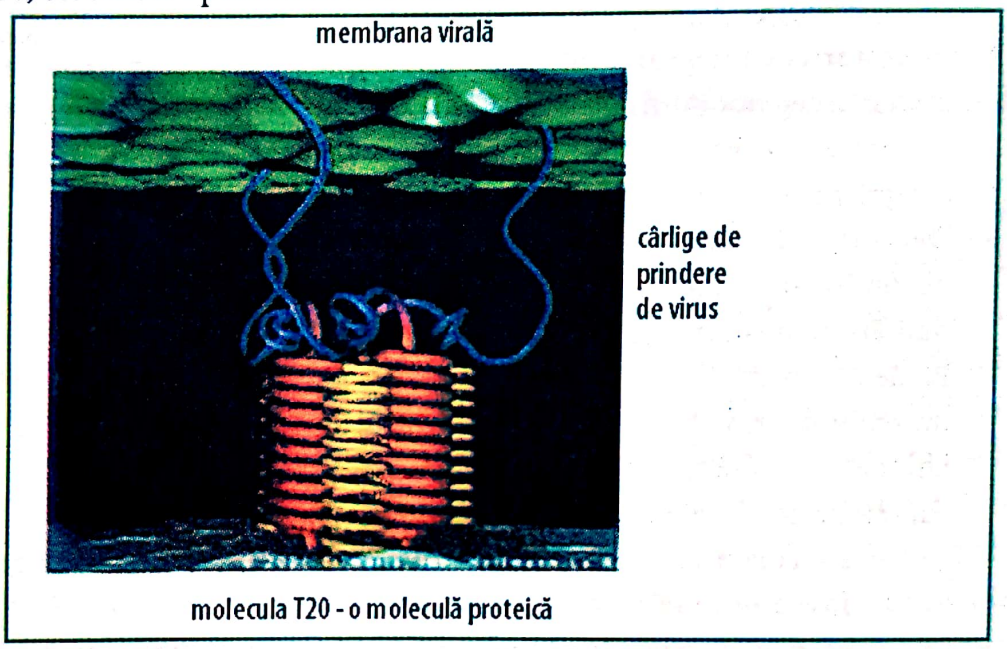


Fig. 181 – Modul de acţiune a moleculei T20 (inhibitor de intrare în celule le polipeptidice). Molecula polipeptidică T-20 prezintă anumite cârlige cu ajutorul cărora se fixează de membrana virală împiedicând pătrunderea virusului în celula umană

Analizând primele informaţii asupra polipeptidei T-20, se constată încă de pe acum următoarele deficienţe:

1. Molecula peptidică T-20 este dificil de fabricat şi deci este foarte scumpă.
2. Nu poate fi aplicată decât prin injectare pentru că este uşor degradată de sistemul digestiv. De aceea tratamentul este unul greoi, inconfortabil. Totuşi, molecula T-20 va avea un rol foarte însemnat, mai ales la începutul infecţiei, nefiind utilă dacă infecţia deja s-a declanşat.

d3. Se caută şi alte soluţii printre care enumerăm:

1. **Blocarea receptorilor celulelor ţintă** ce permit virusului să le infecteze. Această soluţie este destul de riscantă, căci receptori ca CCR-5 şi CXCR-4

Scanned with OKEN Scanner

sunt în mod natural alocaţi perceperii unor semnale chimice care modulează apărarea imunitară.

- Persoanele purtătoare de mutaţii ale genei CCR5 rezistă la orice presiune de infecţie cu HIV şi rămân sănătoase, pierderea acestui receptor fiind probabil compensată de altele.
- Nu se cunoaşte însă nimic asupra consecinţelor ce ar apărea datorită inctivării lui CXCR4. Acest receptor îşi are importanţa sa încă neclară. Cercetătorii au constatat că la începutul infecţiei HIV foloseşte îndeosebi receptorii CD4 şi CCR5 pentru a invada celula. Pe măsură ce are loc invazia, coreceptorul CXCR4 îl surclasează pe CCRS. Ca şi în cazul lui T-20, o substanţă cum ar fi SCH-C, aflată şi ea în dezvoltare, nu ar fi eficace deci decât la începutul infectării şi nu ar mai acţiona în faza cronică.

2. **Inhibitorii de integrază.** Integraza este, la rândul ei, o enzimă care se ocupă cu inserarea genomului viral în ADN-ul celulei şi care, într-un fel, este o continuare a retrotranscriptazei. Prin dezvoltarea unei substanţe care să blocheze această enzimă boala ar putea fi blocată imediat după depistarea ei.
3. **Dezvoltări imunoterapeutice.** În acest sens a fost sintetizată şi este în curs de dezvoltare **interleukina 2,** un mesager chimic care ar determina creşterea numărului de limfocite TCD-4 şi a duratei lor de viaţă.
   Pe de altă parte, aşa cum relatează Hans Wolf în revista „Focus" nr. 49 din 1 decembrie 2003, 25 de grupe de cercetători din zona europeană americană şi chineză lucrează la obţinerea unui „vaccin special" anti-HIV. Noul vaccin va funcţiona conform următoarelor principii:
   - s-a construit în mod sintetic materialul genetic al virusului, iar apoi a fost uşor modificat;
   - în felul acesta s-a obţinut un vaccin asemănător unuia obţinut din virusuri atenuate;
   - vaccinul este injectat unor persoane tester;
   - celulele corpului produc segmente virale care însă nu se pot înmulţi spre deosebire Hi-virusul natural, vaccinul nu se poate strecura *„în secret"* în celule;
   - imunosistemul este provocat să producă cu repeziciune celule speciale de apărare;
   - testele pe oameni au început în august 2003, folosindu-se aşa cum s-a precizat segmente ale genei HIV integrate în vaccinuri virale clasice (vaccinul variolei). Acesta l-a transportat în corpul uman, unde a activat imunosistemul. Până acum vaccinul a fost studiat în Lausanne şi Londra, urmând ca în 2004 să fie folosit în Germania. Se consideră că virusul nu va acţiona optimal de la început, dar se consideră a fi cea mai mare şansă în combaterea de până acum a virusului.

Scanned with OKEN Scanner

Aceste tratamente le-ar permite bolnavilor să trăiască împreună cu virusul, cu condiţia ca efectele secundare să poată fi ţinute sub control.

Până atunci tratamentele standard anti-HIV se numesc triterapii pentru că ele asociază doi inhibitori ai transcripţiei inverse, diferiţi, şi un inhibitor al proteazei. Prin acest tratament deloc simplu şi costisitor, încărcătura virală ajunge la rate aproape nedetectabile (20-50 copii ARN-viral/ml sânge).

Aşa cum s-a spus deja, tratamentele sunt scumpe şi nu eradichează virusul care rămâne totuşi în organism. Am putea spune că virusul HIV a solicitat cercetări şi costuri inimaginabile, pe care nici o altă boală cu caracter epidemic nu le-a solicitat. Eforturile biotehnologilor nu au fost încununate de succes, dar au condus la noi modele de gândire asupra controlului retrovirusurilor, particule foarte periculoase aşezate la limita vieţii şi care pe noile nişe ecologice create de populaţia umană în expansiune şi de nerespectarea legilor simple ale naturii ar putea să se perpetueze aproape necontrolat. ■

3.6.3. Un punct de vedere asupra combaterii prin tehnologii genetice a E.S.B. (Encefalita Spongiformă Bovină)

Este cunoscut faptul că la numai 10 ani înainte de sfârşitul secolului XX a izbucnit în Anglia o teribilă boală de natură ecologică, cauzată de inducerea unor mutaţii prionelor naturale sau normale (Prie), proteine produse uzual de celulele nervoase, de neuroni, dar care nu au un rol activ în ansamblul funcţionării celulelor nervoase şi organismului în general. Au mai degrabă un rol pasiv, adică organismului îi este indifeent dacă ele există sau nu există. Inducerea mutaţiilor a fost determinată de dezechilibrele în nutriţia animalelor, cu inputuri convenţionale nepotrivite. Prionele mutante au devenit prione patogene (PrP.sc) (vezi „Science et vie" din 31 octombrie 2003, p. 871-874 sau „Science et vie" 1036-2004) iar rezultatul mutaţiei a constat în:

a) Modificarea structurii tridimensionale a proteinelor uzuale care alcătuieşte Priona naturală (Pr.Pc).
b) Activarea pe această cale a prionelor naturale şi transformarea lor în prione patogen (Pr.P.sc), deşi termenul patogen nu este tocmai cel mai potrivit.

Efectul, să-i zicem patogen, al Pr.Psc este apariţia E.S.B. sau B.S.E., care a făcut până în prezent peste 374 de morţi şi a produs pagube imense crescătorilor de animale şi industriei alimentare din Uniunea Europeană, iar mai recent în Japonia, SUA şi Canada. Boala, extinsă şi la om, este comparabilă cu cea cunoscută sub denumirea de maladia Creutzfeld-Jacob.

O echipă de cercetători de la Institutul de neurologie al Angliei, ţara în care boala a făcut cele mai mari ravagii, condusă de John Collinge şi Giovanna Malluci şi-au pus în plan a realiza o cercetare care să ducă la eliminarea bolii. Ideea lor pare de-acum extrem de simplă, şi anume: cei doi au pornit de la faptul real că prionele patogene (mutante) (Pr.Psc) provin din modificarea celor naturale.

Scanned with OKEN Scanner

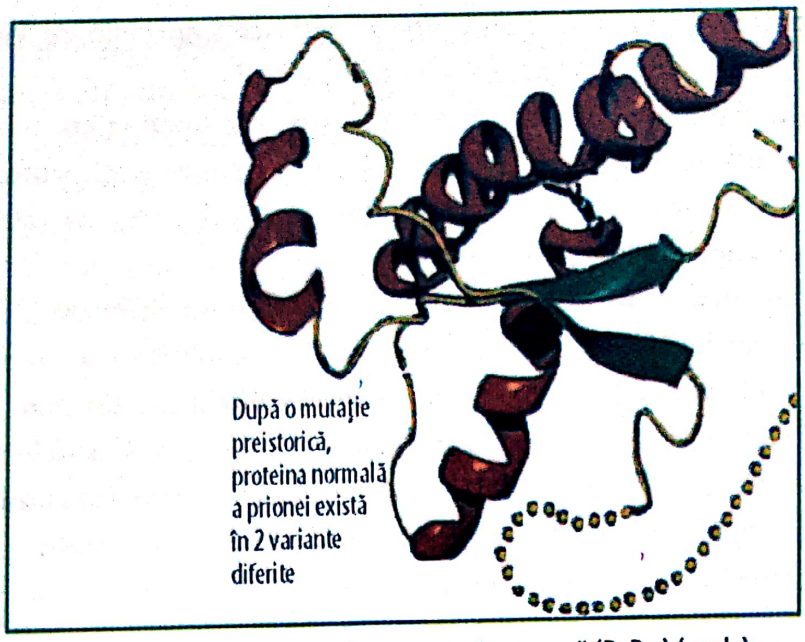


Fig. 182 – Prionă naturală care prin mutație devine prionă patogenă (Pr Psc) (verde). Prionele naturale nu sunt utile celulelor nervoase, dar sunt produse de acestea

Pornind de aici s-a dezvoltat concluzia că dacă vor lipsi prionele naturale (PrPc) nu se vor mai putea forma nici prione patogene (PrPsc) și deci boala nu va mai apărea.

Prin experiențele lor, cercetătorii au blocat deci producția de PrPc în celulele neuronice.

Pentru a realiza acest lucru ei au creat un șoarece modificat genetic care se naște cu o doză normală de PrPc, dar la care după 8-16 zile neuronii încetează să mai sintetizeze această proteină.

Cum era de așteptat, după injectarea în creierul șoarecilor a Pr. Psc, prionele normale (PrPc) au început încetul cu încetul să se transforme în mutante patogene (PrPsc), declanșând la început distrugerea neuronilor prin apariția leziunilor spongiforme, specifice bolii.

Începând însă cu a 8-a săptămână, efectul toxic al PrPsc asupra neuronilor a încetat, cu toate că în mod surprinzător doza de PrPsc a continuat să crească însă în alte celule aflate în creier, cum ar fi **astrocitele**, nu însă în neuroni.

Dimpotrivă, s-a putut constata și comensura că leziunile neurologice au început să dispară, ajungându-se la concluzia că „în acest model toxicitatea prionelor este reversibilă". Ca urmare, șoarecii au intrat într-o însănătoșire lentă dar sigură.

S-a mai ajuns și la alte concluzii interesante cu caracter de cercetare fundamentală că „Evoluția bolii are loc la nivelul neuronilor". Aceasta înseamnă că multiplicarea prionei patogene trebuie să aibă loc la nivelul neuronilor pentru a provoca efectul de îmbolnăvire. Acumularea acestor proteine patogene în alte celule ale creierului nu produce efecte toxice asupra animalelor. Am putea spune că există o diferență încă nedetectată între Pr Psc neural și PrPsc de altă proveniență. Se pune, firesc, întrebarea: ***ce se întâmplă la oameni?*** Sunt ei în întregime sensibili?

Scanned with OKEN Scanner

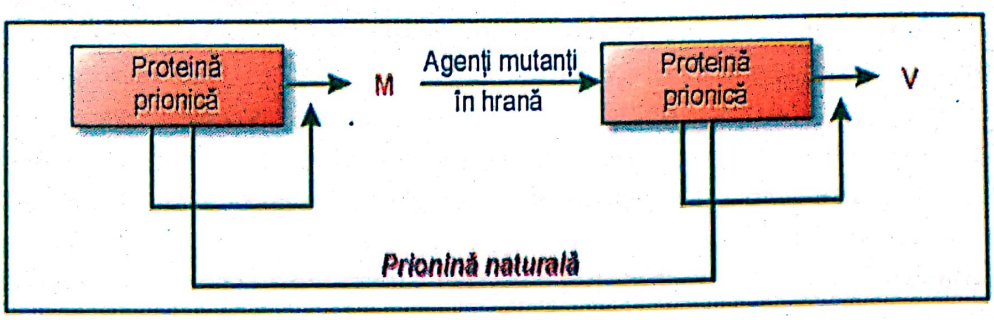


Fig. 183 – Tranformarea proteinelor prionice naturale în prione modificate genetic prin inducerea unor secvențe nucleotide mutante (*original*).
Noile proteine mutante devin vectori care transmit boala de la animale la om sau o difuzează în rândul populațiilor de bovine

Sensibilitatea oamenilor este dată de raportul în care cele două proteine se află în celulele nervoase umane. Astăzi, în Europa, situația este următoarea:

- 50% dintre europeni sunt heterozigoți (M/V), iar aceștia sunt rezistenți la infecțiile cu prione mutante;
- 40% dintre europeni sunt homozigoți de tip M/M, iar aceștia s-a dovedit a fi cei mai sensibili. Toate victimele cauzate de ESB au aparținut acestei categorii genetice;
- 10% dintre europeni sunt homozigoți de tipul V/V, despre care nu se știu prea multe lucruri.

Așadar, jumătate din populația Europei este sensibilă la PrPsc.

Cercetătorii consideră că terapia genetică propusă la șoareci de blocare a sintezei PrPc în neuronii umani poate conduce la stoparea evoluției bolii și la vindecarea bolnavului. Acest lucru nu este posibil azi pentru că suntem încă departe de a realiza la oameni implementarea genei, chiar în mijlocul sistemului nervos central. Acest lucru va fi posibil în 10-15 ani cu siguranță.

Mai aproape de realizare este obținerea unui vaccin care să provoace anticorpi ce se pot lega de PrPc nelăsându-le să se transforme în PrPsc.

Nici medicamentele folosite până acum nu au dat randamentele satisfăcătoare. De aceea cercetările vor continua. ■

3.6.4. Vaccinurile și alte modele de tratamente genterapeutice specifice cancerului

Un vaccin reprezintă o variantă degenerată a unui patogen care are rolul de a stimula imunosistemul în scopul combaterii patogenului foarte activ.

Vaccinurile tradiționale destinate bolilor virale se fabrică pe două căi:

- din particule de virusuri virulente inactivate pe cale chimică sau fizică;
- din particule virale virulente genetic, dar atenuate, slăbite ca activitate biologică, adică practic nepatogene. Este vorba aici de anumite surse virale special selecționate.

În amândouă cazurile se obține o reacție suficient de energică a imunosistemului pentru a distruge patogenul activ ce ar îndrăzni să atace organismul uman.

Scanned with OKEN Scanner

Vaccinurile obţinute biotehnologic se realizează prin tehnici ADN-recombinate cu ajutorul cărora se pot obţine cantităţi mari şi specifice de molecule proteice, care în mod normal şi natural se află pe membrana exterioară a patogenului.

În caz că o proteină sau o secvenţă a ei este în măsură să obţină o reacţie a imunosistemului împotriva patogenului în întregimea lui (intact) atunci ea poate să fie folosită ca şi vaccin.

Ca alternativă la aceste metode pot fi utilizate biotehnologii genetice, care modifică într-atât genomul patogenului încât activitatea infecţioasă a acestuia este foarte diminuată.

Un vaccin obţinut din microbi sau virusuri atenuate cel mai adesea este mult mai activ decât cel obţinut prin subdivizarea macromoleculelor proteice, pentru motivul că în prima variantă se obţine rezolvarea unui puternic răspuns imunitar. De aceea, se poate azi afirma, ştiinţific demonstrat, că patogenii atenuaţi pe cale genetică sunt cu mult mai siguri ca vaccinuri decât cele obţinute tradiţional din mutantele naturale. ■

3.6.4.1. Studiu de caz privind utilizarea unui medicament pentru combaterea cancerului în China

Când Donald Kohn, medic pediatru şi preşedinte al Societăţii Americane pentru Terapie Genetică afirma că „terapia genetică nu este în nici un caz mai miraculoasă decât alte metode de tratament" se baza pe lipsa de succes a concernului Shering în promovarea factorului FGF-4, ca stimulator de noi vase sanguine în cordul pacienţilor suferinzi de angină pectorală. S-a bazat, de asemenea, pe insuccesul utilizării unor medicamente de provenienţă gentehnologică în combaterea leucemiei. Este vorba de cazul în care Jesse Gelsinger moare la vârsta de 18 ani şi de cei doi copii cu o imunitate redusă „x-Scid" îmbolnăviţi şi ei de leucemie după un implant genetic pe celule de măduvă osoasă la o clinică din Paris (revista „Focus" 10/2004).

Iată însă că cercetătorul chinez Peng Zhoouheui, după numeroae studii pe animale şi-a propus chiar în anul 2004 examinarea şi tratarea a peste 10.000 pacienţi cu ajutorul unui medicament denumit „Gendicine" obţinut prin modificarea unor spirale ADN. După o experienţă îndelungată în care şi „factorul întâmplător" are o mare importanţă, Peng a constatat că îndeosebi cancerul căilor respiratorii care ocupă 80% din îmbolnăvirile cu această boală în plan mondial poate foarte bine să fie tratat. Institutul chinez pentru controlul medicamentelor şi produselor alimentare a omologat produsul în anul 2003. Acest lucru s-a făcut în baza unor studii efectuate pe pacienţi cu tumori la nivelul căilor respiratorii (nas şi torace) trataţi cu Gendicine şi radiaţii.

Conform afirmaţiilor firmei Sibio, producătoarea medicamentului, aproape 80% din pacienţi s-au vindecat de tumori, în timp ce numai cu ajutorul radiaţiilor de abia s-a ajuns la un procent de 20%.

Pentru obţinerea medicamentului, Peng a cultivat în laborator adenovirusuri produşi pe cale artificială, care urmau să inducă prin transfer în celula tumorală o genă denumită P 53. În momentul în care secvenţa de genă a pătruns definitiv în celula tumorală, aceştia se autodistrug, iar tumoarea se strânge până la epuizare. P53 se găseşte însă şi în mod natural în organismul nostru, dar îşi pierde efectul o dată ce oncogenele activate declanşează cancerul. Nu se ştie exact de ce, dar se lucrează la această necunoscută.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a-şi extinde tratamentele şi pentru combaterea cancerului intestinal, pulmonar sau de sân, Peng are nevoie în continuare de efectuarea a numeroase studii şi, firește, de omologările proprii. Terapia de acest tip pare o variantă a unui vaccin, deoarece ea induce organismului un P53, care dispare în momentul începerii bolii. Gendicina se aplică printr-o injecție pe săptămână şi costă cca 400 USD, fiind considerat ca cel mai ieftin tratament contra cancerului. Din aceste motive, Peng este asaltat de bolnavi din toată lumea.

Un exemplu privind efectul acestui medicament a fost obținut în cazul conferențiarei universitare Qiyan Zing care, bolnavă fiind de cancer abdominal, deşi a utilizat toate mijloacele chimioterapeutice posibile, cancerul s-a extins cu o viteză incredibilă, cuprinzându-i toată cavitatea abdominală. La clinica de tumori din Peking i-a cerut noul tratament. Tratamentul a apărut în primăvara anului 2003, iar după 3 luni tomoarea a dispărut. Injecția produsului s-a făcut direct în tumoare.

Rezultatul a fost surprinzător, atât pentru medicii clinici cât şi pentru Peng, ținând cont de faptul că boala era într-o fază foarte avansată. După 6 luni de la intervenție, pacienta s-a aflat în condiții de sănătate perfectă. Alți 12 pacienți tratați cu 3 ani în urmă nu au suferit vreo recădere.

„Gendicine este un procedeu terapeutic sigur, dacă ar fi existat ceva probleme am fi oprit imediat testele clinice" - susține Peng. ■

3.6.4.2. Proteina P53

Dr. Peng a lucrat cu proteina P53, fără să ştie exact ce este. Considerată inițial genă, ulterior s-a demonstrat că ea este o fosfoproteină nucleară, o alelă, o secvență de genă alcătuită din 393 aminoacizi, cu o masă moleculară selectivă = 53.000.

Ea a fost inițial socotită factor de transcripție aparținând grupei de proteine tumorosupresoare. De remarcat este însă faptul că nu întotdeauna molecula de proteină îndeplineşte aceste funcții (fig. 184).

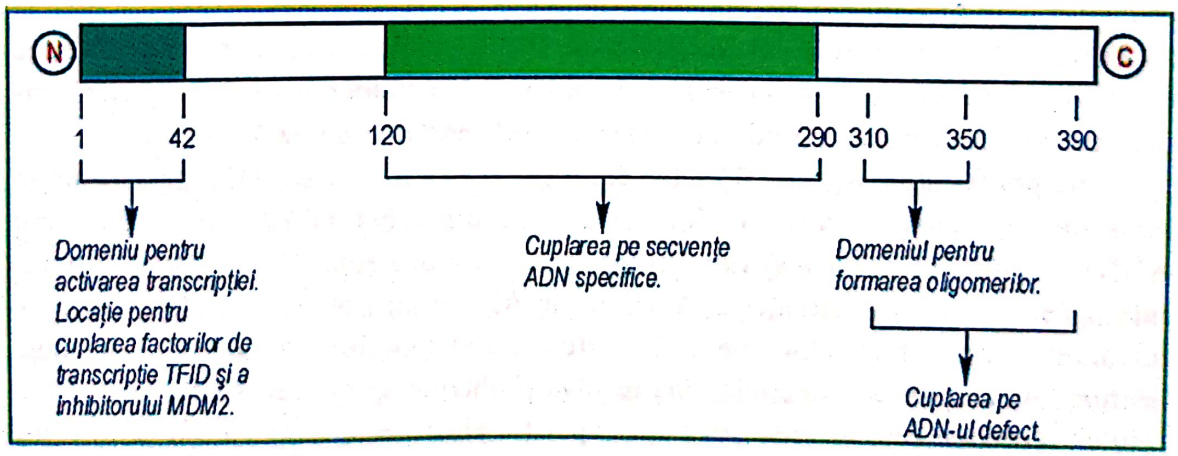


Fig. 184 – Funcții ale proteinei P53.
Proteina P53 se poate lega în diferite locații pe secvență ADN şi poate îndeplini diferite funcții. Cuplată pe secvența ADN din mijlocul specific P53, îndeplineşte funcția tumorosupresoare, devenind un adevărat ucigaş al cancerului. Localizată pe alte secvențe, proteina îndeplineşte şi alte funcții, dintre care foarte importantă este cea a reparării ADN-ului defect sau al activării transcripției în celulele cu probleme (*Lexicon der Biologie, 2004 - prelucrare*)

Scanned with OKEN Scanner

P53 nu este o proteină specifică anumitor țesuturi ci ea controlează proliferarea unui spectru larg de celule și, ca atare, poate repara ADN-ul afectat de radiații, de exemplu în numeroase zone ale organismului unde poate apărea cancerul.

P53 poate suferi anumite mutații care-i pot influența activitatea. Unele dintre ele nu combat celulele canceroase prin regularizarea ciclului celulei, ci dimpotrivă pot fi asociate cu apariția foarte rară a bolii ereditare Li - Fraumeni-Sindrom, care poate conduce la boli de cancer în tinerețe.

De aceea, întreg spațiul de mutații ale P53 este astăzi foarte atent studiat (vezi Lexiconul de Biologie, 2004).

Umare a acestor studii, cercetătorii consideră că pot descoperi puncte de pornire pentru diagnosticarea și tratamentul cancerului. Pentru că P53 oferă multiple protecții împotriva tumorilor, a fost denumită „Molecula anului 1993" sau protectorul genomului (guardian of the genome) prin funcția extrem de complexă care se exprimă numai dacă genomul este „bolnav" și începe să se exprime „altfel decât normal".

Prin tehnica P.C.R. (reacția în lanț a polimerazei, despre care s-a vorbit în detaliu în această lucrare) se permite obținerea în numeroase cazuri diagnosticarea în fașă foarte timpurie a cancerului de prostată. Gena P53 (căci datorită importanței ei a căpătat rang de genă) reprezintă astăzi un important „instrument" privind posibilitățile de combatere a cancerelor.

Terapiile genetice privind utilizarea P53 au început cu Dr. Peng, dar momentan se află în fază de dezvoltare a unor terapii genetice care constau în crearea unei copii funcționale specifice, a genei, în zona celulelor modificate (de cancer), unde rezolvă anormalitatea și distruge celulele canceroase.

Asemenea mutații specifice P53 pot fi utilizate și în imunoterapia cancerului, adică acționează „ca niște vaccinuri" destinate a repara inclusiv ADN-ul defect care se transmite prin moștenire (descendență) (fig. 185).

O celulă sănătoasă nu are deloc nevoie de P53 în nucleul său. Cu toate acestea, ea este produsă în nucleu, însă îl părăsește imediat după producere, prin porii membranei nucleare, transportată fiind în citoplasmă unde este degradată.

Fiind polifuncțională, tot P53 activează o genă și anume GADD45, specializată în repararea proteinelor, inclusiv a celor afectate de radiații. Numai astfel poate fi reparat ADN-ul înainte ca celulele să intre în faza „S". Dacă proteina P53 în forma ei naturală lipsește, atunci, în situația dată, defectele ADN-ului pot conduce frecvent spre formarea tumorilor (carcinoame, cancer etc.). Cu alte cuvinte, dacă se află în celule în momentele diviziunii acesteia, P53 rezolvă problema apoptazei, adică sinuciderea celulei, fenomen care ar crea calea spre apariția altor celule nedorite de felul celor prezentate mai sus. Procesele exacte care conduc spre apoptază nu sunt cunoscute, dar este foarte posibil ca la baza „rezolvării" apoptazei să stea o reacție biochimică, pentru a cărei derulare nu este neapărat nevoie de prezența unei gene.

Apoptaza joacă un rol mare în procesul formării tumorilor deoarece elimină celulele care dezvoltă aceste tumori (celulele de pornire cu ADN defect). Zona de transactivare N-terminal a P53 reacționează cu proteina MDM2 și cu E1B-ul unei proteine

Scanned with OKEN Scanner

oncologice a unui adenovirus. Proteina celulară onco-MDM2 se află cu siguranţă într-o relaţie feed-back negativă cu P53. P53 activează gena MDM2, al cărui produs genetic realizează o recuplare negativă pe N-terminal blocând zona transactivă a P53 şi marchează proteina destinată degradării proteosomale. Dacă p53 este transformat într-o mutantă, cuplarea nu se mai realizează, gena MDM2 este puternic transcrisă, iar o tumoare poate apărea foarte frecvent, aşa cum au demonstrat diferite forme de cancere ale muşchilor. Din fericire pentru organisme, există numeroase alte reacţii care readuc P53 la forma iniţială sau care să conducă la apariţia unor mutante P53 care nu favorizează transcripţia MDM2.

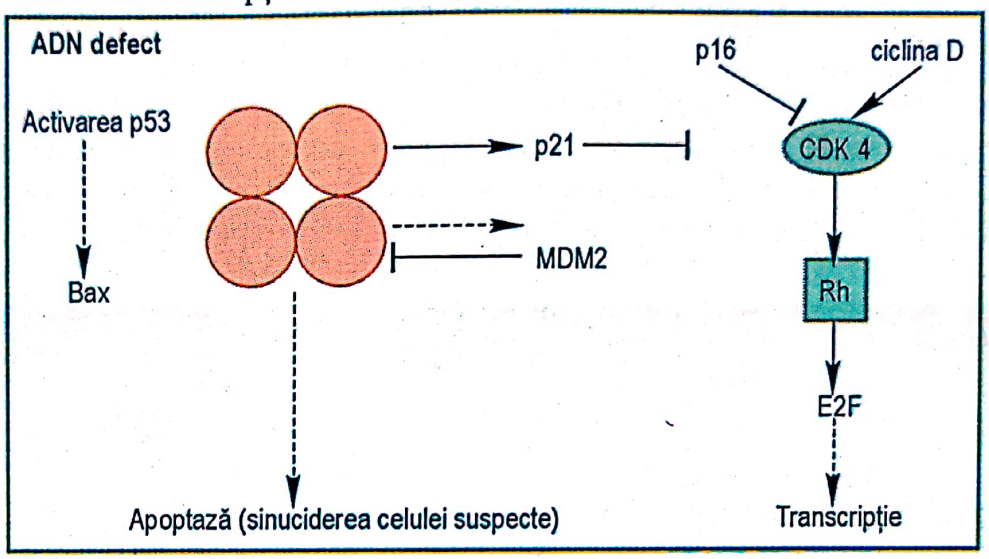


Fig. 185 – Proteina P53 repară ADN-ul defect al celulei.
Activarea P53 se face de către însăşi defecţiunea existentă în ADN-ul celulei. O dată activată proteina acţionează specific în funcţie de faza de dezvoltare în care se află celula, scopul acţiunii fiind acelaşi, protecţia celulei contra unor evoluţii cancerigene. În cazul celulelor aflate în faza Ge (B-mitază) P53 devine factor de transcripţie şi se preocupă de inducerea P21 - un inhibitor CDK - ciclin-kinasă. În mod normal această kinasă fosforilează regulatorul principal al ciclului celulei, tumorsupresorul Rb, care în stare fosforilată (şi numai atunci) pune în libertate factorul de transcripţie E2F, făcând posibilă transcripţia *(desen original)*

Ca o concluzie importantă, este de reţinut faptul că P53 nu dirijează specific distrugerea cancerului ci distrugerea, uciderea tuturor celulelor care nu au o dezvoltare normală, după ce a încercat repararea ADN-ului defect.

Pentru utilizarea ca material terapeutic a P53, care poate fi obţinută relativ uşor *in vitro*, ar fi necesare următoarele:

- Evitarea transportului P53 din nucleu în citoplasmă pentru a obţine efectul de sinucidere a celulelor defecte.
- O altă cale ar fi obţinerea şi dezvoltarea unui inhibitor al tumorsupresorului P53, denumit Pifithrin în limba engleză, care să fie prezent în celulă.

Scopul acestei intervenţii ar fi acela al reducerii activităţii lui P53 în celulele sănătoase, în mod temporar şi reversibil, tocmai ca celulele sănătoase să nu reacţioneze negativ prin efecte secundare la tratamentele clasice anticancer prin procedee chimioterapeutice sau cu iradiaţii.

Scanned with OKEN Scanner

Pornind de la ideea că P53 nu se află deloc în celulele tumorale, numeroşi cercetători au gândit să ofere metode de transport a P53 în celulele tumorale, dar şi de control al activităţii acesteia. În acest sens, revista Focus nr. 19/2004 (pag. 101-102) publică rezultatele unor cercetători americani care, căutând tehnici de luptă împotriva cancerului au găsit un procedeu de transport al P53, crescute in vitro, către celule tumorale, bazate pe chip-uri purtătoare de gene. Chip-urile genă (fig. 186) înmagazinează pe suprafaţa lor până la 64.000 rezervoare ce conţin într-o anumită ordine fragmente ADN, secvenţe pe care se poate aşeza P53 care este transportată apoi spre celulele tumorale. În mod experimental pe animale, chip-urile sunt trimise peste tot în organism pentru a se putea identifica modul de reacţie al diferitelor celule la prezenţa P53. P53, atât în forma naturală cât şi mutaţiile acestora se colorează diferit pentru a putea fi urmărită mobilitatea acestora şi modul de acţiune. Aşa cum am mai spus, scopul acestor cercetări este acela al îndepărtării incertitudinilor legate de identificarea timpurie a bolilor canceroase, de stabilire a originii bolii (ereditară sau indusă), de găsire a unor noi substanţe active şi dezvoltarea unor terapii individuale specifice fiecărui pacient. Este vorba deci de o personalizare a medicinei, o adaptare a ei la caracterele individului rezultate din biodiversitatea vieţii.

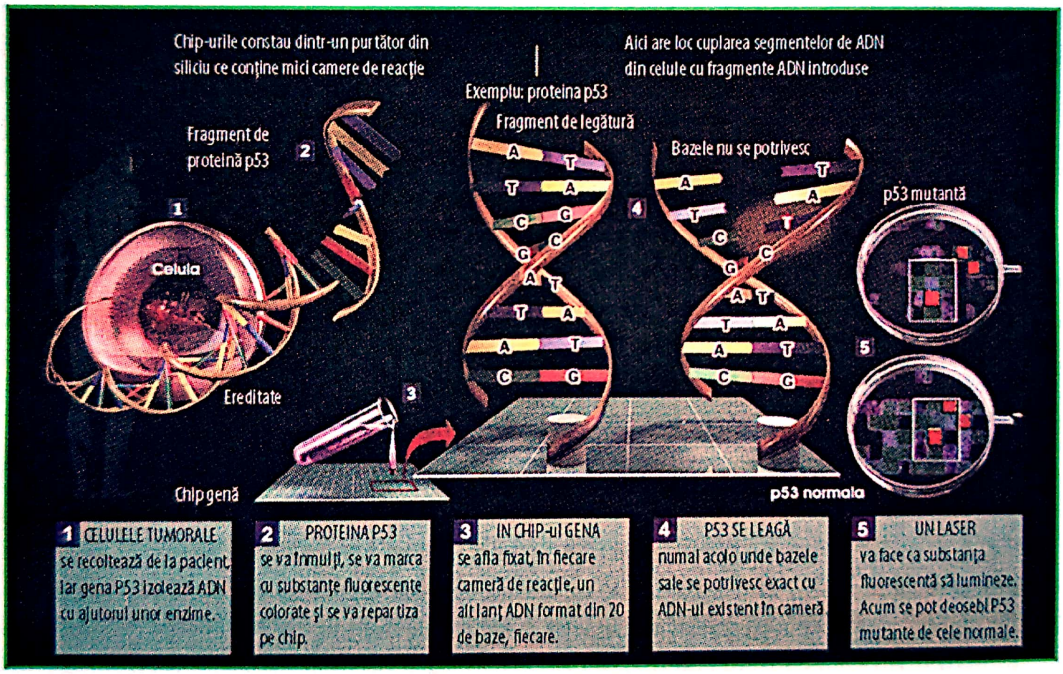


Fig. 186 – Modul de funcţionare a chip-urilor genă.
Detaliu tehnic care urmăreşte nu efectul terapeutic ci doar modul de transport al ADN-urilor în zonele de cercetare spre celulele afectate de posibile boli canceroase (*Focus 19/2004*)

3.6.5. Alte gene terapeutice – avantaje şi riscuri

Experimentele privind folosirea proteinelor în terapia genetică au luat în ultimul timp o expansiune diferită. Aşa cum s-a arătat mai sus, transferul informaţiei genetice în bacteriile care produc proteine destinate medicaţiei se face utilizând un vector care în cele mai multe cazuri este un retrovirus sau un plasmid.

Echipa lui Michel Colos de la Universitatea Stanford, SUA a dezvoltat un nou model de terapie genetică. Noua metodă evită să recurgă la virusuri şi îşi propune să insereze o genă terapeutică direct în ADN. Noua tehnică se bazează pe folosirea unei proteine cunoscută sub denumirea de „integrază", produsă tot de virusuri care infectează în mod natural bacteriile. Integraza, despre care s-a mai vorbit în această carte, este o enzimă care realizează acea „tăiere-lipire" a unei gene codificatoare pentru integrază şi a unei alteia terapeutice. Am putea spune că integraza lucrează mai mult decât o enzimă de restricţie care are rolul de a secţiona, ea face şi lipirea, sudarea unei gene utile în locuri precise şi nicidecum la întâmplare.

Mecanismul acesta a fost testat pe şoareci, cercetătorii injectând simultan gena integrazei şi pe cea a factorului IX, adică o genă produce o proteină care lipseşte unor hemofili, gena terapeutică fiind destinată deci combaterii hemofiliilor, despre care de asemenea s-a vorbit mai sus. Rezultatul a fost acela că gena factorului IX nu se inserează decât în două locaţii ale ADN-ului deşi există 56 de locuri posibile. În plus, integraza permite inserarea unor gene nelimitate ca dimensiuni, lucru care nu ar fi posibil prin utilizarea unui virus drept vector. Metoda are avantaje şi dezavantaje.

Avantajul constă în faptul că renunţându-se la virus ca intermediar în transferul informaţiei, se evită şi eventualele posibilităţi ale unor acţiuni secundare cum ar fi inducerea cancerului (fig. 187).

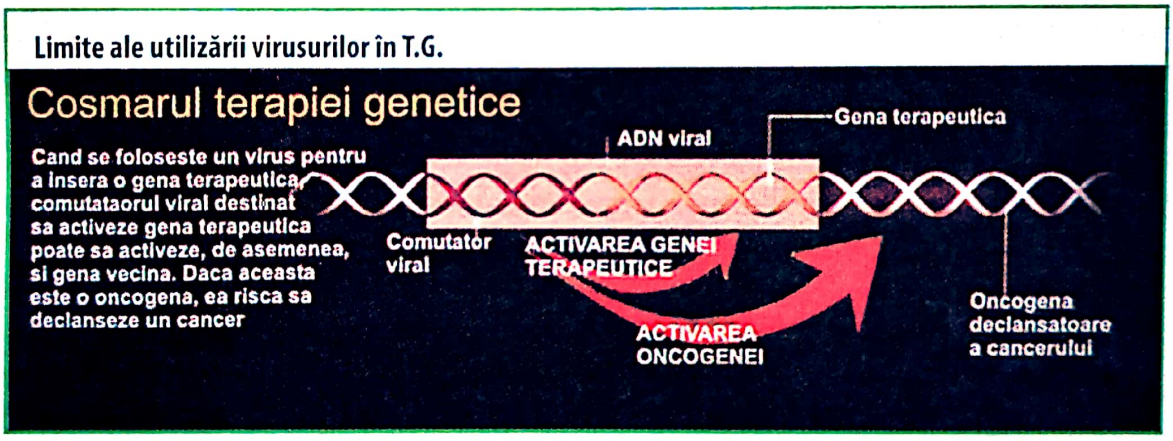


Fig. 187 – Dezavantajele utilizării virusurilor ca vector ai genelor terapeutice.
Utilizarea unui virus ca vector pentru inserarea unei gene terapeutice poate face ca comutatorul viral care activează gena terapeutică să poată activa şi o genă vecină care poate fi una oncogenă crescând în felul acesta pericolul declanşării unei forme de cancer (*Science et vie, 1023, decembrie 2002*)

Prin activarea genei oncogene, care reprezintă de fapt o acumulare graduală de materiale mutante, se realizează simultan şi decuplarea genei tumor depresoare. O genă oncogenă **ras** şi o genă mutantă tumor supresoare -P53 (despre care s-a vorbit mai sus) sunt adesea aşezate una lângă alta şi ele ar putea fi activate, respectiv decuplate de către comutatorul viral. În acest caz, cancerul ar fi declanşat în mod inevitabil după modelul din figura 148, care se referă la cancerul de colon.

Trebuie să precizăm însă că activarea oncogenelor şi suprimarea genelor tumor-supresoare (P53) nu aparţine numai comutatorului viral ci numeroşilor altor factori,

Scanned with OKEN Scanner

fie de natură internă, fie externă. Important este faptul că terapiile genetice ce se elaborează astăzi să nu deţină potenţialul unor efecte secundare care ar putea favoriza formarea cancerului.

Avantajul metodei mai constă în faptul că s-a dovedit superioară metodelor precedente din suprimarea inducerii secundare a cancerului.

Marele dezavantaj al metodei constă în modul de injectare. Acesta este intravenos, sub presiune puternică, ceea ce riscă să producă leziuni în celulă şi să trimită materialul genetic peste tot în organism, chiar şi acolo unde nu este nevoie de el. O altă limitare a metodei constă în faptul că nu se poate aplica la terapia genetică a măduvei osoase, deoarece pot fi uşor lezate celulele. ■

3.6.6. Genele în ajutorul retinei

Deşi în domeniul oftalmologiei s-au făcut progrese uluitoare, medicii sunt astăzi dezarmaţi în faţa majorităţii bolilor degenerative ale fundului de ochi, fie ele ereditare, fie legate de vârstă. Cercetările recente făcute pe animale demonstrează că dezvoltarea unor terapii genetice şi celulare fac să se intrevadă o speranţă şi în acest domeniu. În cele ce urmează încercăm să prezentăm aceste speranţe pentru două boli grave:

- **Retinopatia** - este cel mai frecvent o boală ereditară ce afectează diferite celule ale retinei, dar îndeosebi celulele fotoreceptoare şi pigmentare. Vinovate de instalarea bolii sunt, ca de obicei genele mutante, iar până în prezent au fost identificate 131 de mutaţii, fără ca cineva să poată spune că au fost identificate toate (Science et vie, decembrie 2002, pag. 64).
- **Rodopsina**. Este un segment vizual al bastonaşelor implicat în reacţii biochimice, care transformă energia luminoasă în energie electrică, ajungându-se în creier la „senzaţia vizuală", la configurarea imaginii.

Retinopatia apare, de regulă, la vârsta de 50 de ani. Macula, punctul central al retinei, se degradează lent. Încetul cu încetul vederea se întunecă, uneori până la dispariţie. Boala în sine devine o problemă reală de sănătate publică, deoarece dereglările maculare legate de vârstă (DMLV) sunt cele mai frecvente dintre bolile degenerative legate de vârstă. În Europa există peste 11 mil. persoane afectate, din care numai în Franţa sunt peste 1,5 mil. În România, deşi sunt mulţi bolnavi, ei nu sunt monitorizaţi aşa cum sunt cei bolnavi de SIDA, de tuberculoză sau chiar de cancer. Riscul creşte cu înaintarea în vârstă, dar şi cu evoluţia „neclară a populaţiei umane de o aşa manieră încât OMS vorbeşte de o adevărată epidemie ce va crea probleme reale şi grave populaţiei umane". Aceasta poate şi pentru faptul că 80-85% din DMLG nu reacţionează la nici un tratament. Deşi sunt deja cunoscute 131 de gene implicate în boli ale retinei, complexul genetic responsabil de monitorizarea vederii este sensibil la interacţiunile cu mediu. Foarte numeroşi pacienţi (peste 40.000 numai în Franţa) adesea foarte tineri, suferă de retinopatie pigmentară de origine pur ereditară care atinge retina periferic.

Institutul de oftalmologie din Paris, condus de Alain Sohel, speră că rezolvarea problemei vine tot de la tehnologiile genetice. Citäm: „Deşi încă incompletă, cunoaş-

Scanned with OKEN Scanner

terea aspectelor genetice ale acestei boli lasă să se întrevadă noi piste de tratament îndeosebi prin terapie genetică".

În acelaşi timp, cercetătorii INSER (Institutul Naţional de Sănătate şi Cercetare Medicală al Franţei) afirmă: „Combaterea acestor boli ar putea constitui unul dintre primele exemple de eficienţă a terapiei genetice la om.

Primele rezultate încurajatoare au fost obţinute în cercetările spectaculoase efectuate de Jean Bennett de la Universitatea din Pennsylvania care a reuşit să redea vederea unor câini tineri bolnavi de Amanreaza Leber, o boală asemănătoare retinopatiei pigmentare la oameni. Etapele efectuate până acum au fost următoarele:

a) S-a identificat gena umană care provoacă dereglarea vederii încă de la naştere. În fond, este o genă defectă identificată la P.P.E. 65 care codifică o proteină cu acelaşi nume ce intervine în sinteza pigmentului vizual - rodopsina. Acest defect trebuie reparat.

b) Folosind un vector virus, se încearcă repararea genei defecte sau înlocuirea ei cu o genă activă, normală, prin mijloacele de-acum cunoscute. S-a constatat în experimentele pe animale că în 6 săptămâni de la implantarea genei sănătoase funcţiile celulelor retinei au fost restaurate.

c) Ca alternativă s-a propus introducerea direct în ochi a genelor terapeutice (sănătoase) care vor constrânge celulele să producă ele însele enzima PPE 65 şi sinteza pigmentului vizual. O altă posibilitate ar fi să se transforme o genă care generează o proteină ce blochează proliferarea anormală a vaselor sanguine în retină, tulburare caracteristică celei mai grave forme DMLV.
Primele terapii genetice ale bolilor retinei ar trebui să fie testate la om în jurul anului 2007.
Ca şi în cazul anterior prezentat există şi **un risc** şi anume acela că prin folosirea unui retrovirus pe post de vector, în mod secundar există pericolul inducerii unor cancere prin activare de către comutatorul, promotorul viral nu numai al genei PPE 65 ci şi al unor oncogene tot timpul alături de gena utilă.

d) Pentru a evita acest risc în varianta de asemenea alternativă, alţi cercetători studiază „pista terapiilor celulare". De data aceasta, ca şi în cazul bolii Parkinson, nu se mai pune problema „transferării unei gene terapeutice, sănătoase în ochi, ci de a implementa celule vindecătoare". Sahel a demonstrat deja că, conurile au nevoie pentru a supravieţui de RdCVF1, o substanţă proteică secretată de bastonaşe. De aici şi ideea de a grefa bastonaşe pentru a încetini sau bloca distrugerea conurilor. În acelaşi timp, se cercetează şi injectarea în retină de celule modificate genetic pentru a produce RdCVF1. Pentru a evita respingerea lor de către sistemul imunitar, implanturile vor fi incapsulate. Deşi testele pe oameni privind aceste ultime tehnici vor începe prin 2006, este de aşteptat ca o terapie comercială, mai ales cu celule noi înlocuitoare, este posibilă prin anii 2013-2014. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.7. UTILIZAREA TEHNICILOR GENETICE ÎN MEDICINA LEGALĂ

Medicina legală reprezintă acea activitate instituționalizată care apelează foarte mult la tehnologiile genetice pentru depistarea unor persoane care săvârșesc crime sau alte fapte antisociale grave.

De regulă, la locul faptei, mai întotdeauna rămân pete de sânge, resturi de țesuturi, de îmbrăcăminte sau alte obiecte, aparținând fie făptașului, fie victimei, fie amândurora. În cazul unor cazuri de viol, făptașul își lasă sperma. Dacă sunt recoltate suficiente celule, laboratoarele de medicină legală pot determina încă multă vreme grupa de sânge și tipul țesuturilor. Aceste teste simple sunt însă limitate în ceea ce privește posibilitatea de a putea conduce la identificarea persoanelor din următoarele motive:

- Testele au întotdeauna nevoie de probe proaspete într-o cantitate suficientă, ceea ce nu este întotdeauna posibil.
- Există mulți indivizi într-o populație care are aceeași grupă de sânge sau același tip de țesuturi.
- Aceste tehnici ar putea, în cel mai fericit caz, să rezolve problema unei bănuieli, însă nu poate livra dovezi clare asupra unei fapte criminale.

Analizele asupra ADN-ului pot aduce dovezi pentru depistarea făptașului cu un mare grad de siguranță, deoarece secvențele de baze ADN sunt unice pentru fiecare persoană (cu excepția gemenilor). Analiza RFLP prin Southern-Bloting este una din cele mai eficace privind detecția asemănărilor și diferențierilor dintre probele ADN și necesită o cantitate extrem de mică de sânge sau țesuturi (circa 1000 celule). În cazul unei crime sunt suficiente cantități infime de sânge de la locul faptei spre a fi analizate. Sonda radioactivă marchează banda gel-electroforeză care conține anumiți markeri RFLG. Medicina legală cercetează în mod obișnuit cinci markeri. Aceasta pentru că chiar și un număr atât de mic de markeri ai unui individ pot prefigura un print-ADN, asemănători unei amprente digitale și care este denumită „amprentă digitală genetică", care în nici un caz, cu excepția gemenilor, nu poate fi similară la 2 indivizi. Asemenea amprentă digitală genetică este prezentată în figura 188.

Obținerea elecroforetică a amprentei genetice poate fi însă folosită și în alte scopuri ale medicinii legale, precum:

- Stabilirea paternității unui copil, în caz de neînțelegeri între mamă și un posibil tată, pe această temă.
- În stabilirea poziției unui individ în arborele genealogic al unei familii, mai ales pentru familiile care își conservă numite ranguri „nobile". În felul acesta s-a demonstrat, de exemplu, că Kaspar Hanser n-a fost prinț moștenitor al landului Baden - Würtemberg, Germania, iar Anna Anderson n-a fost niciodată fiica ultimului țar al Rusiei, cunoscută sub numele de Anastasia.
- Tot pe această cale s-a putut demonstra că președintele american Thomas Jefferson a avut o relație amoroasă și conjugală cu una din sclave, Sally Hemings, din care a apărut cel puțin un copil, ceea ce dovedește o tradiție a președinților Marii Americi de a nu-și putea ține închise fermoarele sau nasturii pantalonilor.

Scanned with OKEN Scanner

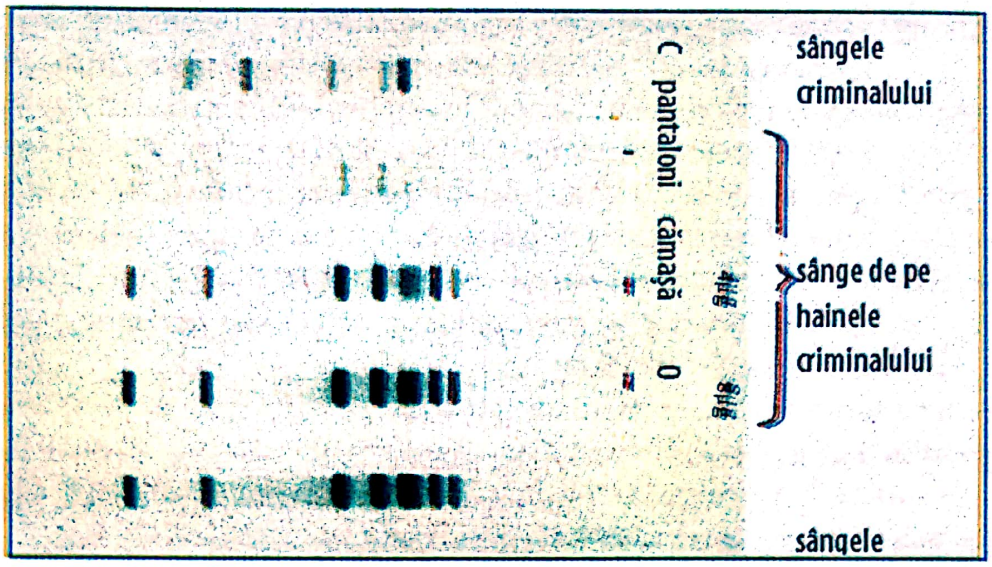


Fig. 188 – Amprenta genetică într-un caz de crimă.
Din analiza RFLP rezultă că ADN-ul cuprins în petele de sânge de pe îmbrăcămintea învinuitului este identic cu cel al victimei însă se deosebeşte foarte mult de cel al învinuitului. Aceasta dovedeşte că sângele de pe îmbrăcămintea învinuitului provine de la victimă şi nu este al lui. Zece markeri RFLP diferiţi rezultă pe patru poziţii diferite ale acestei radiografii. Benzile de ADN din gel electroforează sunt hibridate una după alta cu diferite sonde după ce sonda iniţială s-a dezvoltat suficient, înainte ca următoarea să fie folosită (*ilustraţie după Colick R.B. şi Pasternac J.J.*)

– Ultimele cercetări în acest domeniu demonstrează că varianta mai lungă a ADN-ului satelit se foloseşte din ce în ce mai frecvent ca markeri pentru obţinerea amprentei genetice. ADN-ul satelit mai este denumit şi ADN-repetitiv, pentru că apare adeseori în genomul diferitelor specii în plus faţă de necesar şi poate uşor să apară „benzi-satelit" în procesul de intra-centrifugare a ADN-ului genomului. La mamifere, şi deci şi la om, el apare în procent de 10-15, iar fiecare unitate repetitivă are un număr de 1-10 perechi de baze. În mod obişnuit, sateliţii ADN se află între 100.000 şi 10 milioane fiind împărţiţi în:
  - minisateliţi ADN 100 - 100.000 | perechi de baze
  - macrosateliţi ADN 10 - 100 |

Cei folosiţi ca markeri sunt, de regulă, microsateliţii şi ei sunt extrem de variabili de la o persoană la alta. Putem exemplifica acest lucru în felul următor:
Individul 1 deţine pe o poziţie a genomului una din cele 65 de repetiţii ale unităţii de bază A.C.A., iar a 118-a repetiţie este plasată pe o altă poziţie etc.
Individul 2 va deţine cu siguranţă o frecvenţă diferită a repetiţiilor pe aceste locaţii genomice, ceea ce îl va face să se diferenţieze semnificativ de primul.
Acest polimorfism al **Locilor genetici** este denumit în mod obişnuit ca simplu tandem repetitiv - STRs (simple tandem repeats), iar metoda analitică rezultantă este denumită analiza STR. Aşadar dacă:
  - în analiza RFLP avem de-a face cu o variaţie a locaţiilor segmentelor de restricţie,

Scanned with OKEN Scanner

- în analiza STR datorită lungimii diferite a suplimentelor STR (fragmente genetice superfluu), acest lucru nu mai este necesar. Deşi seamănă, cele două metode sunt foarte diferite pentru că în primul caz se lucrează cu ADN secvenţionat, iar în al doilea cu ADN natural. Cu cât este mai mare numărul de markeri analizaţi dintr-o probă de ADN, cu atât este mai mare probabilitatea ca amprenta genetică să fie mai sigură.

- Adeseori este necesară aplicarea tehnicii P.C.R. (Polimerase Chain Reaction - reacţii polimerazice în lanţ) pentru multiplicarea anumitor markeri STR, obţinuţi prin gel-electroforeză.
- Din motive de selectivitate, analiza P.C.R. este deosebit de valoroasă, mai ales atunci când ADN-ul este într-o „stare proastă" sau este disponibil numai în cantităţi foarte mici. Un rest de ţesut, fie şi de numai 20 de celule, este suficient pentru amplificarea, copierea genei PC.R.
- Se pune problema cât de sigură este amprenta genetică pentru anchetatori. Dacă s-ar putea face o analiză asupra întregului genom al persoanei incriminate ar fi excelent şi indubitabilă analiza. În practică însă testele ADN ale unei persoane necunoscute se limitează la numai vreo 5 regiuni importante ale genomului. Este cunoscut că zonele ADN alese pentru teste sunt variabile de la un individ la altul. Calculele statistice arată că probabilitatea ca 2 indivizi să aibă aceeaşi amprentă genetică variază între 1:100.000 şi 1:1.000.000.000, ceea ce face ca probabilitatea identificării unui inculpat să fie extrem de mare şi să implice riscuri cu mult mai mici decât cele umane foarte frecvente în toate sistemele juridice din lume, fără a implica aici pe cel românesc. De fapt, cei mai numeroşi experţi judiciari şi cercetători în domeniu consideră **amprenta genetică** ca fiind cu mult mai sigură decât aceea a martorilor oculari, adică a acelora care pretind că au văzut cu proprii lor ochi înfăptuirea unui act criminal. ■

3.8. GENELE ŞI INTELIGENŢA UMANĂ

Era normal ca rezultatele excelente obţinute prin manipularea genetică în mărirea performanţelor economice, ale plantelor şi animalelor ca şi cele obţinute pentru vindecarea unor grave boli dobândite ereditar să trezească interesul pragmatic al unui important segment al populaţiei privind modul cum ar putea să fie mai performantă din punct de vedere intelectual populaţia umană.

Dacă e să o spunem mai direct, numeroase laboratoare de specialitate şi universităţi americane au primit extrem de numeroase cereri în acest sens, îndeosebi de la oameni bogaţi care ar dori ca odraslele lor să aibă un IQ mult mai ridicat. Ca urmare, problema nu putea să nu intre în preocuparea cercetătorilor.

În acest sens, Robert Plomin, cercetător american şi profesor la disciplina „Relaţii dintre genetică şi comportamentul uman" a Institutului de Psihiatrie a „King's College" - Londra, s-a preocupat cu studierea găsirii genei sau genelor care ar putea conduce la manipularea inteligenţei umane. După efectuarea unor cercetări asupra a peste 10.000 perechi de gemeni consideraţi genii, până în prezent Plomin şi echipa sa

Scanned with OKEN Scanner

nu a descoperit nici o genă care să se preocupe exclusiv de funcţionarea creierului şi deci de mărirea IQ-ului (Focus nr. 2, ianuarie 2004).

Inteligenţa în concepţia lui Plomin, a altor cercetători dar şi a noastră, „aparţine celor mai complexe însuşiri şi funcţii biologice ale omului". Este extrem de greu, practic imposibil, a se determina un segment ADN care să ne identifice capacitatea de a ne face mai deştepţi, mai inteligenţi. Faptul că Plomin a ajuns la această concluzie nu l-a demotivat în a căuta originile inteligenţei umane şi în ce măsură aceasta este condiţionată genetic sau nu.

Concluziile obţinute până în prezent sunt următoarele:

1) Nu există o singură genă sau un grup mic de gene care să se preocupe de inteligenţa noastră, ci aproape întregul genom, mai exact circa 75% din gene sunt coparticipante la acest aspect important.
2) Nu există nici o genă a cărei participare la procesul de creare a inteligenţei umane să depăşească 1%. „Efectul genelor, luate izolat, asupra inteligenţei este atât de mic încât noi, cu mare dificultate, am putut identifica aceste efecte", afirmă Plomin.
3) Transmiterea ereditară de la părinţi la urmaşi a „prostiei" sau inteligenţei se ridică la 50%. Aşa că putem afirma că nimeni nu se naşte foarte deştept.
4) Celelalte 50% ale volumului inteligenţei noastre se datorează factorilor exogeni, care pot favoriza sau defavoriza procesul. Printre cei mai importanţi enumerăm: şcoala, familia, atmosfera în societate, poluarea cu efectele ei, habitatul etc. Interesant este faptul că raportul între transmiterea ereditară (TE) şi mediu (M) nu este constant 1:1 deci $TE/M \neq 1$, de-a lungul vârstei. La copiii mici efectul mediului M este foarte mare, aprox. 80%, în timp ce genomul influenţează cu numai 20% formarea inteligenţei. La copiii ajunşi la pubertate efectul genomului asupra inteligenţei creşte la 40% pentru ca la adulţi să ajungă la 60% (fig. 189).
5) În perioada de copilărie, atunci când se creează de fapt sistemul nervos şi deci şi inteligenţa umană, genele lucrează pentru noi, în sensul că ele „caută în relaţia cu mediul cea mai bună soluţie intelectuală pentru noi oamenii". Rezultă deci că există o interacţiune între gene şi mediu care n-a fost încă suficient studiată. Aşa cum se vede şi din figura 188, anumite gene devin active o dată cu pubertatea, atunci când au fost realizate anumite procese calitative ale maturizării umane.
6) În ceea ce priveşte implicarea numărului de gene active în procesul de gândire şi formare a inteligenţei, se estimează că dacă numărul total al genelor umane se situează între 40.000 şi 50.000, atunci circa 30.000 de gene au, într-un fel sau altul, o legătură cu creierul nostru, cu celulele noastre nervoase care prin anumite însuşiri creează inteligenţa manifestată (IQ-ul). Identificarea participării cantitative şi calitative a celor 30.000 de gene la realizarea capacităţii intelectuale umane, constituie o preocupare care va necesita un număr foarte mare de ani. Manipularea unui număr atât de mare de gene este deci imposibilă cel puţin în următorii 50 de ani.

Scanned with OKEN Scanner

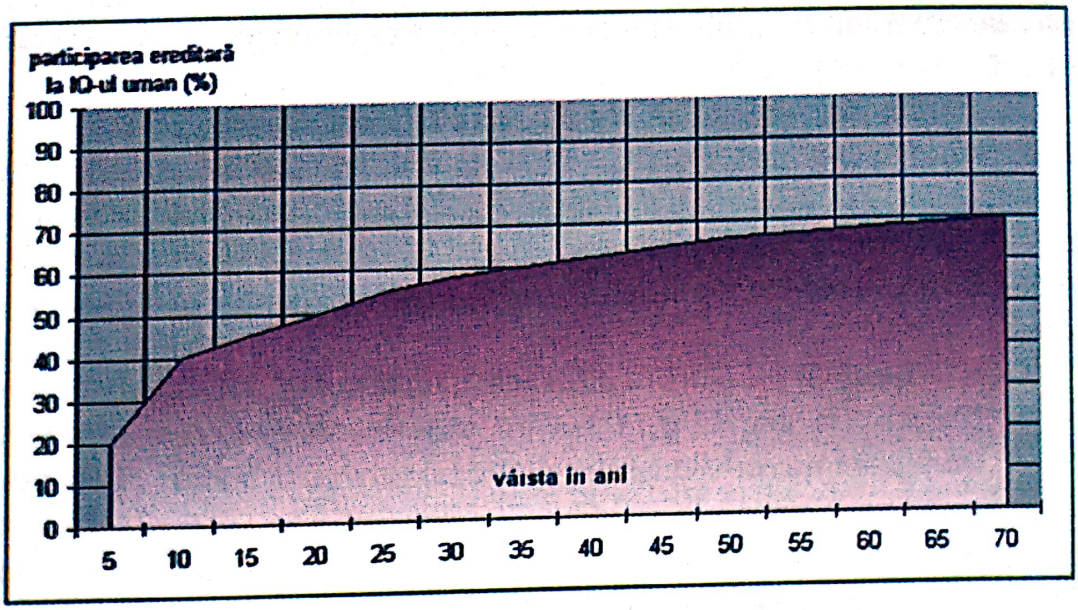


Fig. 189 – Dinamica participării genelor la realizarea IQ-ului uman.
Participarea eredității la consolidarea inteligenței umane crește cu vârsta. Studiile lui Plomin s-au limitat la vârsta de 35 de ani iar prin extrapolare se consideră că la 70 de ani ereditatea participă cu 70% la IQ-ul individual. Așadar, dacă părinții noștri au fost deștepți sau proști aflăm de-abia la bătrânețe (*prelucrare după informațiile lui Plomin si Focus 2/2004*)

7) Activitatea creierului este integral coordonată de gene. Dacă, de exemplu, într-o singură sinapsă mii de molecule care se interacționează cu multe altele din creier, sunt inactive, prin modificarea transmiterii semnalelor, reacția intelectuală poate să sufere, la fel și construcția ei. Studiile au arătat că capacitatea sinapselor de „a se potrivi", de a colabora, influențează „împachetarea celulelor nervoase" și în mod deosebit și mărimea creierului, adică capacitatea de a gândi. Genele pe care le caută Plomin, cu siguranță că determină aceste mari efecte, determinate de aceste puține, chiar foarte puține însușiri.
8) Rezultă deci că genele nu trag după ele nivelul IQ și deci nu ne pot stabili propria noastră soartă. **Genele sunt acelea care lansează în noi apetitul pentru a ne învăța și a ne educa, curiozitatea de a ști cât mai multe, de a descoperi natura și viața, în cifre, cuvinte și imagini, capacitatea de a gândi și utiliza efectele gândirii.** Genele nu sunt deci purtătoare de talent și inteligență. Oricât de potrivite ar fi genele unui individ pentru o inteligență de excepție, acest lucru nu se va întâmpla **dacă mediul nu va colabora cu genele în realizarea optimă a inteligenței.** Dacă oamenii sunt buni sau răi, deștepți sau proști, acest lucru la maturitate nu este determinat decât în procent de 50% de gene. Fiecare om are o șansă de a deveni deștept dacă genele lui întâlnesc un mediu prielnic pentru această dezvoltare. Același lucru este valabil și pentru latura negativă a lucrurilor, adică pentru proști, tâmpiți sau răi. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.9. RELAȚII DINTRE MEDIU ȘI TEHNOLOGIILE GENETICE

Tehnicile genetice joacă și vor juca un rol din ce în ce mai important și în ecologie. Capacitatea microorganismelor de a fabrica substanțe chimice organice, evoluate, este extrem de valoroasă, inclusiv pentru practicile industriale care vor suferi în anii care vin ai secolului XXI modificări majore. În acest scop cercetătorii modifică astăzi aceste însușiri de a schimba substanțele chimice fabricând microorganisme de mare valoare economică sau pentru rezolvarea unor probleme ecologice. Iată câteva direcții de lucru:

- Depoluarea unor zone de metale grele precum: cupru, plumb, nichel etc. cu ajutorul unor microorganisme care extrag din mediu aceste substanțe periculoase și le depozitează sub formă de sulfați. Prin aceste procedee chimice aceste metale pot fi recâștigate pentru procesele tehnologice. Biotehnologii au pregătit miroorganisme manipulate genetic, care ar putea mări de până la 1000 de ori randamentul de bioacumulare al acestor reziduuri, numai că în practică ele nu au fost solicitate până acum, demonstrând în continuare o neglijență a societății umane față de mediul în care trăiește.
- Capacitatea microorganismelor în schimbul de substanțe ar putea de asemenea să fie folosită pentru degradarea deșeurilor și dezintoxicarea, decontaminarea cu anumite substanțe chimice. În stațiile de epurare se folosesc deja bacteriile și alte microorganisme pentru transformarea, degradarea unor legături organice în forme netoxice sau în produse de echilibru final prezente în mediu (H_2O, CO_2, H_2 etc.) Un număr foarte mare de legături organice aruncate astăzi pur și simplu în mediu, număr care crește cu fiecare zi a existenței omului pe pământ, nu mai pot fi degradate cu ușurință. Multe dintre ele, cum ar fi derivații cloruați ai hidrocarburilor, sunt foarte reactivi. Biotehnologia lucrează la modificarea genetică a unor bacterii de o asemenea manieră încât și aceste legături ajunse la stațiile de epurare să fie degradate. Asemenea bacterii ar putea fi utilizate și în procesul de fabricare în scopul distrugerii, degradării unor produse secundare periculoase, toxice, înainte ca acestea să ajungă în râuri sau alte elemente ale mediului înconjurător.

  Un domeniu învecinat de cercetare îl constituie identificarea și modificarea genetică a unor bacterii care să poată neutraliza prin dezintoxicare, decontaminare marile depozite de reziduuri toxice provenite din anumite segmente ale industriei petroliere. Apare deci posibilitatea ca genele responsabile de asemenea transformări să fie introduse în diferite microorganisme, care să permită dezvoltarea unor sușe care în condițiile unei catastrofe ecologice să permită o rapidă refacere a calității mediului să degradeze toate toxinele și să recupereze substanțele utile. ■

Scanned with OKEN Scanner

3.9.1. Energia viitorului aparţine bacteriilor modificate genetic

Bazată pe utilizarea energiei fosile înmagazinată în milioane de ani, economia mondială se vede azi în situaţia de a intra într-o criză majoră, pornind de la reducerea surselor acestora. Natura conflictelor internaţionale de azi are la bază, de asemenea, problemele strategice pe termen scurt ale surselor de energie pentru care marii coloşi industriali ai lumii, care sunt şi cei mai mari consumatori, îşi pun în funcţie cel mai sofisticat armament, pentru a acapara zonele energetice ale pământului.

Pe de altă parte, sursele alternative de energie, sunt din punct de vedere tehnic încă la începutul lor iar studiile arată că, în forma în care şi-au început evoluţia nu oferă o şansă majoră pentru înlocuirea celei convenţionale. Ce este de făcut în aceste condiţii? ■

3.9.1.1. Există bacterii care transformă materia organică în gaz

Marile centrale electrice şi termice funcţionează pe gaz, cărbune sau petrol, materiale energetice fosile, obţinute prin heteropolicondensare biocatalitică într-o perioadă de multe milioane de ani. Astăzi, o omenire în expansiune logaritmică nu mai are timp să aştepte milioane de ani pentru ca actuala materie organică să devină energie fosilă.

De aceea, cercetătorii şi-au pus întrebarea dacă nu cumva „timpul poate fi comprimat" şi au trecut la căutarea unor mijloace prin care materia organică primară brută, aşa cum rezultă ea din procesele de fotosinteză şi din lanţurile trofice, să poată fi convertită în energie uşor disponibilă activităţilor economice.

Studiile foarte numeroase care s-au făcut au demonstrat că soluţia există, iar ea trebuie căutată tot în natură, aşa cum am prezentat în moto-ul acestei lucrări. Fiinţele care pot realiza această fenomenală scurtare a timpului se numesc **bacterii**, aparţinând procariotelor, din care mai fac parte virusurile şi poate încă câteva microorganisme monocelulare.

Aceste mici fiinţe microscopice sunt prezente cu milioanele de jur împrejurul nostru, în cel mai mic eşantion de sol, de aer sau de apă iar unele dintre ele sunt special dotate cu însuşiri care induc transformarea materiei organice în **gaz**. Am spus pur şi simplu gaz pentru că există numeroase gaze, dintre ele cel mai important fiind metanul (CH_4). În acest sens au fost realizate şi primele instalaţii industriale de mare capacitate, care utilizează de regulă deşeuri organice.

Emmanuel Jullien, jurnalist specializat, anunţă în revista „Science et vie" din august 2003 că în Franţa există o unitate industrială de transformare a materialelor reziduale în energie, care prelucrează pe an 100.000 t de deşeuri furnizând 14 MW/h electricitate (fig. 189). Extrapolată la 7,4 milioane t de deşeuri fermentabile produse anual în Franţa, aceasta ar reprezenta 5,18 TW/h (teravaţi/oră), ceea ce înseamnă circa 1% din producţia naţională franceză. Este puţin, este mult, e greu de spus, deşi trebuie să reţinem de aici că prin aceste tehnici bacteriene de obţinere a energiei se împuşcă trei iepuri deodată şi anume:

- producere de energie ieftină şi foarte puţin poluantă;
- depoluarea mediului de deşeurile organice;
- obţinerea unui îngrăşământ organic foarte necesar agriculturii ecologice.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă asemenea energii ar fi implementate în spaţiul românesc şi ar fi luate în seamă şi deşeurile obţinute din agricultură şi industria alimentară, s-ar putea uşor obţine, ţinând cont de consumurile actuale de energie, cel puţin 6-8% din necesarul naţional, ceea ce ar echivala cu puţin sub producţia reactorului de la Cernavodă.

Obţinerea energiei prin metanizare este suficient de dezvoltată în ţări mari agricole ca Australia, Noua Zeelandă, America de Sud şi sudul Americii de Nord etc. Cu toate că reprezintă o importantă sursă de energie, de fermă şi de îngrăşământ organic, producerea energiei prin metanizare este departe de a satisface necesarul energetic al viitorului.

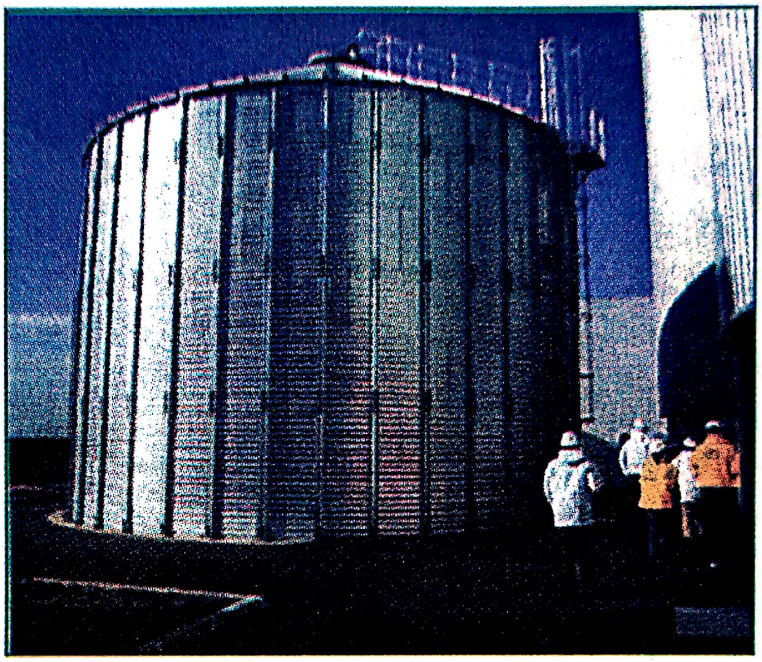


Fig. 190a – Într-un bioreactor, dintr-o tonă de deşeuri organice se obţin 170-320 m^3 biogaz

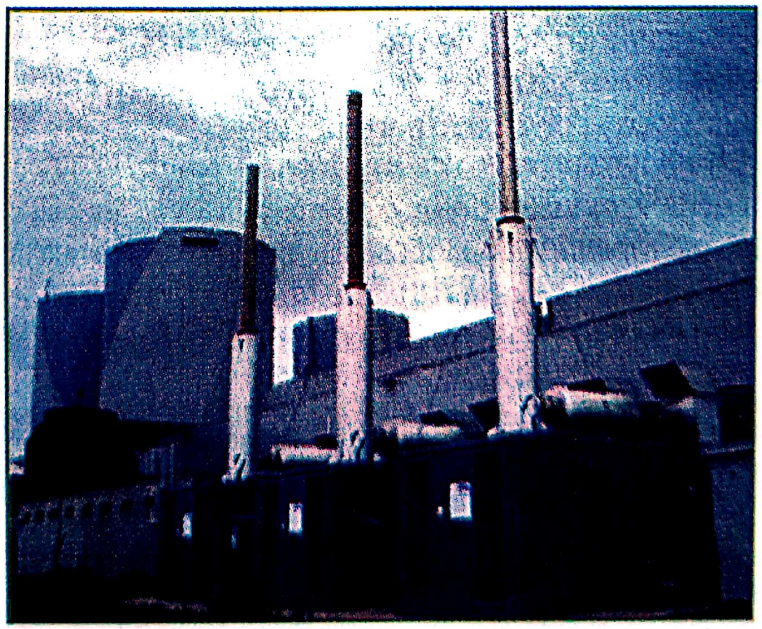
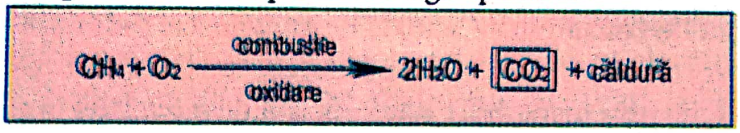


Fig. 190b – În centrala electrică, biogazul (biometan) este transformat în electricitate care este folosită pe plan local sau livrată sistemului comercial naţional sau unor firme private

Scanned with OKEN Scanner

Pe de altă parte, biometanul este o hidrocarbură ca și cea fosilă, care prin ardere provoacă totuși CO_2, care este sau poate fi un gaz poluant.



3.9.1.2. Combustibilul viitorului va fi hidrogenul

Deși este prezent în natură în cantități imense, el este localizat în aer și apă (H_2O) o moleculă extrem de stabilă, care asigură stabilitatea vieții pe pământ și, de aceea este greu de extras sau se poate extrage din apă cu costuri enorme, nesuportabile. Depozitarea lui prin lichefiere este o tehnologie însă insuficient elaborată.

Craig Venter este un celebru biolog american care, împreună cu alți cercetători americani au participat la nu mai puțin celebrul proiect „Genomul uman" fiind alături de Bill Clinton și de Tony Blair atunci când s-a anunțat descifrarea acestuia „ca o descoperire mai importantă decât aselenizarea, ca cel mai important eveniment istoric de la Constituția americană și până în prezent". Acest lucru se întâmpla în iunie 2000, când Craig Venter stabilise că genomul uman conține 120.000 gene, urmând ca un an mai târziu, tot el, să revină și să susțină că numărul de gene din ADN-ul uman este totuși limitat la 42.000, diferența constând în repetabilitatea multora dintre ele. Descifrarea genomului uman a condus la relansarea biotehnologiilor moleculare nu numai în domeniul medicinii și al manipulării genetice a plantelor și animalelor despre care am scris de nenumărate ori, ci și în dezvoltarea biotehnologică a unor importante sectoare industriale, inclusiv producerea de energie.

Venter s-a implicat în ultimul timp în crearea unor organisme vii, firește microscopice, probabil tot bacterii care să înlocuiască producerea metanului, prin producerea de hidrogen (H_2) considerat a fi cea mai nepoluantă formă de energie, gazul ideal pentru proiectarea „economiei verzi" ce va trebui să apară în următoarele decenii.

Metoda pe care o propune Venter este de-a dreptul spectaculoasă și anume „Crearea unor microorganisme extrem de eficiente care să extragă hidrogenul din apă prin fotosinteză". Asta înseamnă că creeze o „formă de viață" care ar produce gaz curat, folosind în permanență energia reînnoibilă - în flux continuu care vine de la SOARE și care, în același timp, ar reduce prin fotosinteză cantitatea de CO_2 din atmosferă, redând acesteia puritatea de care are nevoie pentru refacerea echilibrelor ecologice. Ideea este de-a dreptul fantastică! Dar este ea oare realizabilă? **Bacteriile de care vorbește Venter nu sunt încă prezente în natură sub forma superactivă** pe care ar dori-o el.

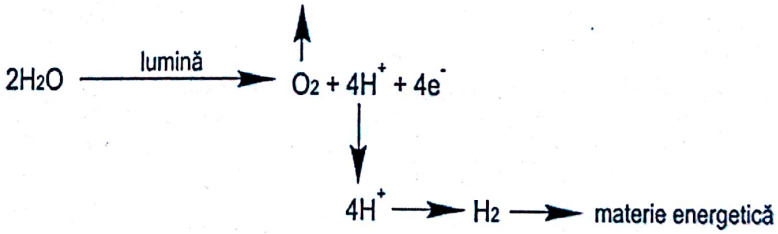
Există însă așa-numite cianobacterii (fig. 191) care trăiesc în apă, sunt capabile să deruleze fotosinteza, dar ele nu produc hidrogen decât în condiții speciale și anume în anoxie (adica în lipsa oxigenului) sau într-un mediu sărac în azot, în cantități limitate sau pentru o perioadă scurtă de timp (tabelul 192).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 191 – Cianobacteriile conţin material genetic care le imprimă aptitudinea de a produce hidrogen prin fotosinteză - caz special în lumea procariotelor. Producerea hidrogenului are loc numai dacă bacteriile trăiesc în mediu anaerob sau în mediu lipsit de nutrienţi şi, îndeosebi, azot

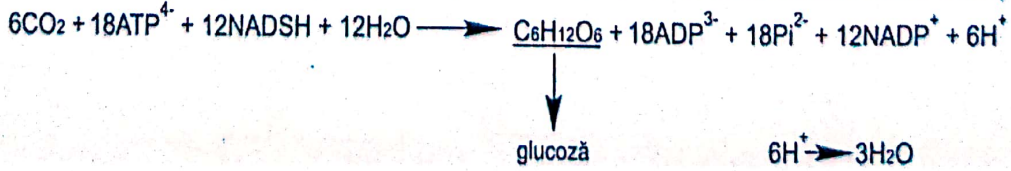
Hidrogenul se poate forma în procesul fotosintezei în două feluri:

a) Prin absorbţia luminii şi descompunerea apei conform reacţiei :



Oxigenul din apă este eliminat în atmosferă, el nu este fixat în plante, în timp ce hidrogenul poate fi extras din celule înainte de a se iniţia alte reacţii oxidative. Electronii sunt transferaţi unui receptor primar denumit chinon Q, identic cu coenzima Q urmând ca apoi să fie transferaţi unui receptor secundar $NADP^+$ pentru a fi redus în NADPH. Dacă între coenzima Q şi $NADP^+$ se interpune un alt captator, electronii pot fi mobilizaţi într-un sistem care poate produce curent electric.

b) Hidrogenul se mai poate forma şi ca urmare a fixării CO_2 în stadiile 2 şi 3 ale fotosintezei în prezenţa ATP^{4-} şi a moleculelor NADPH, conform reacţiei:



Aici trebuie reţinut că atât carbonul cât şi oxigenul din glucoză provin din dioxid de carbon. Teoria conform căreia oxigenul din glucoză ar proveni din apă a fost infirmată de multă vreme. Prin folosirea unor gene specifice, biotehnologii vor încerca să capteze cât mai mult hidrogen liber, superflu în celule înainte ca acesta să treacă în radicali OH^-, foarte dăunători organismelor de orice fel.

Există însă şi alte organisme unicelulare cum ar fi algele din genul *Clamydomonas*. Ele nu sunt bacterii şi se plasează în grupa imensă a vieţii aparţinând sistemelor eucariote.

Aceste alge au însă capacitatea de a produce hidrogen dacă dispun de puţin soare şi apă. Acest lucru le conferă calitatea de a fi candidaţi interesaţi pentru selecţiile biotehnologice, mai ales dacă li se vor conferi calitatea de a produce şi hidrogen liber, pentru că în sistemul natural hidrogenul produs de ele este imediat recuperat şi reciclat chiar în interiorul celulei. Cu energia soarelui sau materie organică, bacteriile extrag electroni din materie. Ele le restituie prin enzime către atomi de hidrogen pentru producerea de gaz H_2.

Microorganisme care produc hidrogen

Cu energia soarelui sau materie organică, bacteriile extrag electroni din materie. Ele le restituie prin enzime către atomi de hidrogen pentru producerea de gaz H_2.

Tabelul 192

Microorganisme care produc hidrogen şi modul specific de lucru

Sursa de energie	Microorganism	Enzimă producătoare	Specific
Lumină şi apă	micro-alge	hidrogenaza cu fier	producţie în absenţa O_2 eficace pe termen scurt slabă pe termen lung
Idem	Cianobacterie fixatoare de azot (Anabaena, Nostoc...)	nitrogenaza	producţie posibilă în prezenţa aerului, randament slab/mediu dar durabil
Idem	Cianobacterie non-fixatoare (Synecoctis Synechoccus...)	Hidrogenaza cu nichel şi fier	producţie în absenţa O_2 relativ slabă şi puţin durabilă
Fotofermentaţie			
lumină + carbohidraţi sau acizi organici	bacterii purpurii	nitrogenază	producţie anoxică, viteză slabă/medie de producere dar durabilă şi o utilizare excelentă a substratului
Fermentaţie			
carbohidraţi, acizi organici	majoritatea organismelor fotosintetice producătoare de H_2	aceeaşi ca în prezenţa luminii	în întuneric, în absenţa O_2 şi în prezenţă de carbohidraţi, în general mai puţin eficace decât fotoproducţia.
idem	bacterii strict anaerobe	hiodrogenaza la fier	anaerobie, producţie eficace în cinetică şi utilizare substrat, sensibilitate extremă la O_2
idem	bacterii facultativ anaerobe	hidrogenaza la nichel şi fier	productivitate şi utilizare a substratului medii, producţie anaerobică dar tolerantă la urme de O_2
Carbohidraţi, acizi organici, monoxid de carbon (CO)	Diverse tipuri de bacterii anaerobe	cuplare CO/ dezhidrogenaza + hidrogenaza	anaerobă, randament bun, cale interesantă de utilizare a CO ivit din piroliza biomasei, de exemplu.
Idem	Bacterii hiper sau termofile (Pyrococus, Termotoga, ...)	Fe-hidrogenază sau Ni-Fe hirogenază	anaerobic la temperaturi înalte (60-95°C) eficacitate şi productivitate bună a utilizării substratului.

Scanned with OKEN Scanner

3.9.1.3. Proiectul Craig Venter de obținere a bacteriilor ce produc hidrogen

Dacă se analizează datele înscrise în tabelul 192 și se compară cu dorințele lui Venter, putem spune că **„organismul ideal nu există"**, iar același Venter răspunde: „El poate fi însă creat".

Metoda: Modificarea genetică a acestor microorganisme, dar nu oricum, ci prin tehnici explicate de el care afirmă: „Într-o bacterie există o multitudine de procese biochimice activate a căror singură funcție este adaptarea microorganismului la mediul său. Se estimează că 90% din genomul bacteriilor este mobilizat pentru această adaptare. Acest lucru înseamnă enorm de multă energie irosită.

Toate laboratoarele și toți cercetătorii care se ocupă de această problemă își pierd timpul încercând să blocheze căile metabolice inutile care deturnează bacteria (ființa vie) de la scopul ce i-a fost repartizat prin selecție și evoluție. „Eu doresc să construiesc un organism, mai bine zis un microorganism care să nu se distreze deloc cu alte preocupări și care să se concentreze 100% asupra sarcinii sale, aceea de a produce energie". Așa cum spuneam, ideea este foarte bună, cum recunoaște chiar celebrul biolog, s-ar putea să nu-i reușească niciodată. Dar tot el insistă: "Este oare acesta un motiv pentru a nu încerca această experiență?"

Metodologia este, din punct de vedere biotehnologic, cunoscută și constă din următoarele:

- Alegerea din natură a celor mai valoroase organisme care conțin gene ce induc producerea de hidrogen;
- Preluarea genomului acestora și secționarea, secvenționarea lui cu ajutorul enzimelor de restricție. În bruionul format din secvențe nucleotidice se află și acele fragmente de gene sau gene întregi care au capacitatea de a face fotosinteză și de a produce hidrogen.
- Din milioanele de gene sunt identificate exact cele folositoare prin folosirea unor sonde ADN radioactive, care conțin capete de benzi ADN ce cuprind perechi de baze ce se cuplează prin punțile de hidrogen cu cele ale genelor căutate. Se realizează în felul acesta sinteza noilor gene.
- Prin electroforeză în gel poliacrilic sunt separate genele utile și reținute prin metoda Southern pe filtru.
- Genele reținute pot fi prelucrate pentru fabricarea noului cromozom care va conține numai material genetic specializat.
- O bacterie gazdă va pierde genomul ei originar ca urmare a unei intervenții cu iradiații, iar în locul lui va fi introdus noul cromozom, utilizând principiul hibridizării cu un plasmid sau cu un alt vector (poate fi și un retrovirus). În mare, această metodologie este prezentată în figurile 154 și 155, iar, în acest caz, figura 193. Rezultatul va fi o nouă bacterie orientată 100% spre producerea de hidrogen pornind de la energia solară.

Craig Venter afirmă că un asemenea microorganism nu a fost încă obținut. „Noi îl vom realiza și apoi, întâmple-se ce s-o întâmpla", afirmă el. Lucrurile nu stau chiar așa. S-au creat foarte numeroase organisme modificate genetic cu un grad mai mic sau

Scanned with OKEN Scanner

mai mare de înlocuire a materialului genetic originar. E drept, nici unul în domeniul energetic şi, tocmai de aceea, acest proiect este extrem de valoros.

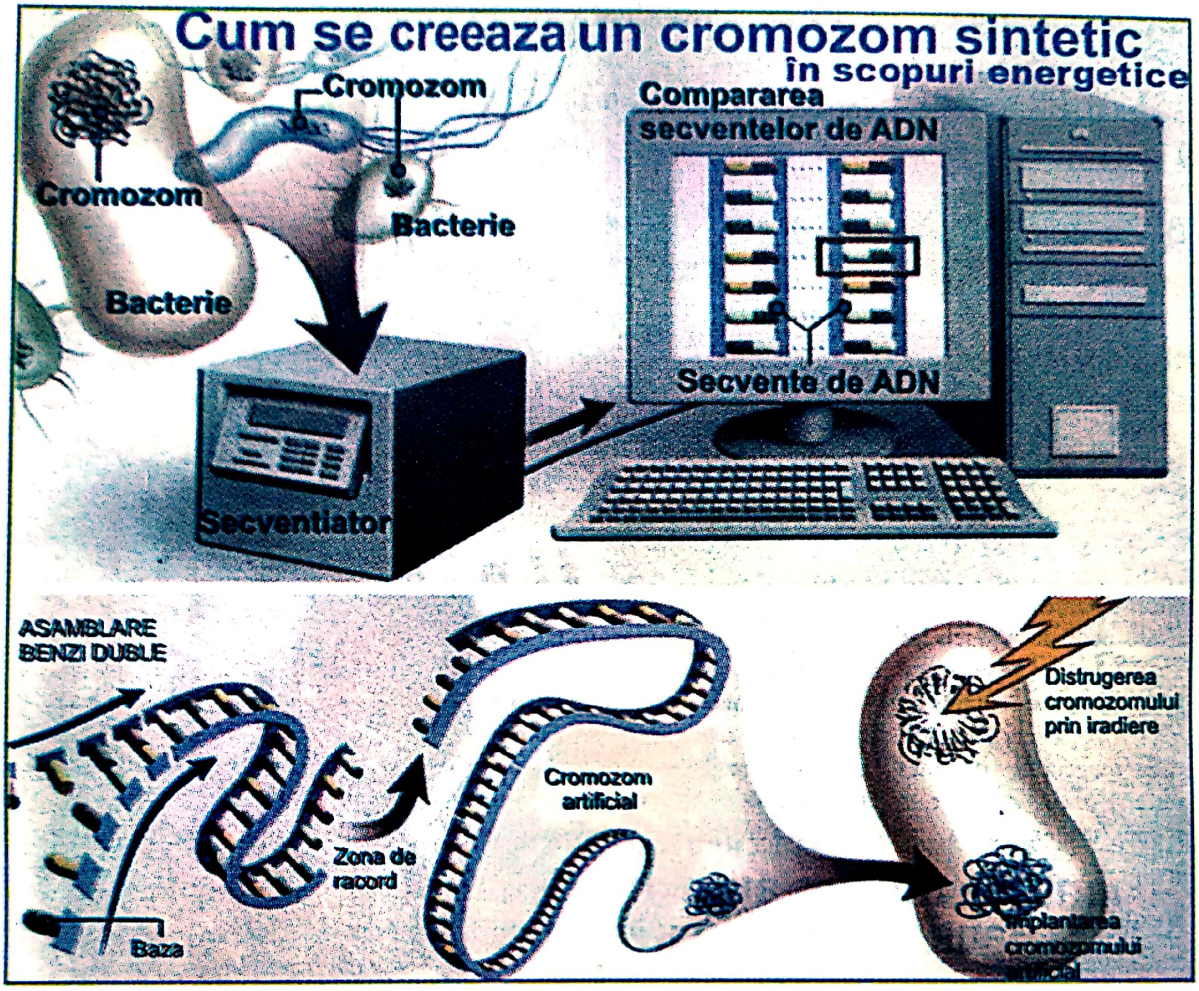


Fig. 193 – Etapele obţinerii genetice a unui organism orientat prioritar spre producerea de hidrogen, urmare procesului de fotosinteză

„Vom încerca aceste experienţe chiar începând din acest an" ... afirmă Venter care estimează că ar putea să se pronunţe parţial asupra viabilităţii proiectului său cam spre sfârşitul acestui an (e vorba de anul 2003). În ceea ce priveşte căile de abordare a experienţelor, ţinând cont de concurenţa acerbă în acest domeniu, Venter nu spune mai nimic. Tot ceea ce ştie este că deja construcţia cromozomului „artificial"[1] atribuit nu tocmai potrivit pentru că nu e vorba de sinteză, ci de o recombinare a unor fragmente ADN, deja existente în natură) este deja în curs de realizare şi că treaba avansează bine.

Este vorba de o muncă de 11 ani în care echipele lui Craig Venter au segmentat genoamele a peste 100 de bacterii pe care apoi le-au trecut prin sita selecţiei ADN - prezentate mai sus, din care până în prezent au fost identificate cel puţin 300 de gene din cele care sunt indispensabile supravieţuirii organismelor, dar care conţin şi însuşirile de a fabrica hidrogen. 300 de gene reprezintă însă prea puţin pentru construcţia

[1] Artificial este impropriu, pentru că toate nucleotidele care se asamblează sunt exclusiv naturale, extrase din genomul a sute de alte bacterii recent studiate.

Scanned with OKEN Scanner

unui cromozom artificial care ar avea nevoie de cel puțin 1000 de gene. De aceea, echipa celebrului biolog lucrează în paralel la fabricarea unor sute de mii de perechi de baze care să permită apoi asamblarea unor zeci de mii de secvențe nucleotide pentru ca, în final, prin reasamblarea lor să construiască o bandă gigantică de ADN mult mai lungă decât s-a produs până în prezent.

Fiind vorba de un proiect de interes național, Craig Venter a primit de la guvernul american o subvenție de 2 milioane USD cu ajutorul cărora a creat o fundație științifică denumită IBEA (Institute for Biological Energy Alternatives - Institutul pentru Energie Biologică Alternativă), iar pentru continuarea cercetărilor, omul de știință a cheltuit din propriul său buzunar peste 100 milioane USD, în fundația sa ce deține unul din cele mai mari centre de secvenționare genomică denumit TIGR.

Aici, în TIGR, pe parcursul dintre laborator și computer, se derulează o operație majoră a proiectului acestui **organism artificial gentehnologic**, adică cercetarea noilor bacterii și colectarea materialului genetic valoros pentru alcătuirea ADN-ului superspecializat în producția de hidrogen. Acest lucru este foarte complicat și seamănă cu „a căuta acul în carul cu fân" căci, spune el, „Trebuie știut că un simplu mililitru de apă conține 1 milion de bacterii. Și noi cunoaștem mai puțin de 1% din ce se află acolo", adică cel mult 10.000, am spune noi, ceea ce este deja foarte mult din punctul nostru de vedere. Optimist și foarte activ, Venter studiază acum identificarea și evaluarea tuturor microorganismelor vii din apa prelevată în largul Floridei, în Marea Sargaselor cunoscută și sub denumirea de Triunghiul Bermudelor. Alegerea a fost determinată de observații mai vechi care arată că „această zonă este sediul unei activități biologice intens studiată în detaliu de cincizeci de ani și unde absența nutrienților face fotosinteza primordială". Obiectivul său constă în a obține o cartografiere genetică a tuturor microorganismelor vii ce se găsesc în aceste eșantioane de apă. „Vom descoperi sute și sute de bacterii noi și, fără îndoială că e munca cea mai interesantă pe care am făcut-o vreodată. Și totodată cel mai mare proiect de descoperire de noi specii din toată istoria biologiei."

O dată ce toate genoamele vor fi înregistrate într-o bancă de date (bioinformatică) va fi suficient pentru a se pleca la vânătoarea de gene. Pornind de la secvența cunoscută a unei gene legată de fotosinteză ar fi posibil, de exemplu, să se depoziteze în baza de date tot ce seamănă mai de aproape sau mai de departe cu această secvență. Se va selecționa și utiliza ceea ce este mai bun, mai eficient. Noul organism o dată creat (i se spune incorect sintetic) este dotat cu aptitudini de ultimul „răcnet" și va fi suplimentat înainte de a fi trimis la treabă într-un bioreactor cu un mecanism de distrugere (de regulă o proteină specifică), care ar conduce la autodistrugerea bacteriei, dacă aceasta ar scăpa din bioreactor și ar coloniza mediul înconjurător.

Acest lucru devine o condiție indispensabilă pentru cercetătorul care nu dorește să fie făcut responsabil de o catastrofă ecologică.

În concluzie, putem afirma că „bacteriile sunt adevărate centrale electrice". Metanogenele care se găsesc peste tot, folosesc deja pentru a se produce metan pe scară industrială. Prin fermentarea unei molecule de glucoză se produc 2 molecule de metan. Cianobacteriile sau bacteriile purpurii dețin știința de a obține hidrogen în

Scanned with OKEN Scanner

funcție de capacitatea lor în acest sens, pornind de la lumină. O dată create, noile bacterii superdotate cu aceste aptitudini, va fi nevoie de câteva bioreactoare de maximum 10.000 mp în total pentru ca aceste microorganisme să asigure întreaga energie a Franței din acest moment și cel mult 1000 mp pentru a acoperi întregul necesar de energie la zi al României. Există deja stații pilot, mici biodigeratoare care produc hidrogen plecând de la amidon și celuloză. Surprizele cercetătorilor vor continua. În ceea ce privește randamentele, cercetătorul Laurent Cournac afirmă că randamentul maxim al producerii fotosintetice a hidrogenului se apropie de 10% în condiții în care randamentul natural al fotosintezei se cantonează la 1%. Dacă aceste proiecte vor prinde viață, viitorul energetic al planetei nu va mai fi deloc în pericol. ■

3.9.1.4. Pilele electrice bacteriene devin o realitate

Se pare că deja există primele realizări considerate de acum „istorice" în producerea durabilă a electricității cu ajutorul bacteriilor. Este foarte posibil ca în scurtă vreme biopilele sau biobacteriile să înlocuiască într-o zi nu prea îndepărtată pe cele clasice. Ar fi în concepția unor biotehnologi o dovadă certă a unei revoluții privind energia. Această descoperire vine după anunțurile făcute de Craig Venter privind folosirea biotehnologiilor pe sisteme procariote asupra producerii energiei viitorului și reprezintă acel pas mic pe care omenirea trebuie să-l facă pentru a ajunge la pasul mare propus de Venter. Această descoperire foarte importantă a fost făcută public recent de Uwe Schröder, cercetător în electrochimie la Universitatea din Greifswald, Germania. Avem de-a face, deci, cu o descoperire germană, ca avanpremieră la marele proiect american prezentat mai sus. S-a văzut deja mai sus că unele bacterii sunt capabile de a „fabrica electricitate", până în prezent însă, producțiile au fost atât de mici, încât au fost considerate nesemnificative. Descoperirea lui Uwe Schröder a condus însă la obținerea unei biopile sau bioacumulator, biobacterie etc., producând o intensitate de 1,5 miliamperi/cm^2 (MA/cm^2), care reprezintă o realizare semnificativă, pulverizând recordul de intensitate a unui curent electric generat de o manieră durabilă cu ajutorul microorganismelor.

În realizarea biopilei electrice (prezentată în figura 192) s-au folosit bacteriile specifice *Escherichia coli*, care, așa cum s-a văzut, este un microorganism monocelular foarte prezent în mediul înconjurător și, înainte de toate, în intestinele noastre. Un curent de 1,5 miliamperi este pentru cercetători o cifră incredibilă, greu de comparat cu rezultatele obținute până în prezent cantonate la niveluri de câțiva microamperi (MA/cm^2). Este, în același timp, un pas important spre realizarea comercială a pilei bacteriene.

Câteva date comparative

Pilele care utilizează bacteriile ar putea revoluționa lumea energetică. Actualele pile bazate pe tehnologii chimice au nevoie, consumă produse purificate precum hidrogenul, metanul sau metanolul. Ele conțin, de asemenea, multă platină pentru a permite derularea reacțiilor chimice. Or, acest lucru le face foarte scumpe. Din contră, în cazul biopilelor, bacteriile, material gratuit, înlocuiesc platina. În ceea ce privește combustibilul, acesta se reduce pur și simplu la apă sau la diferite forme de materie organică.

Scanned with OKEN Scanner

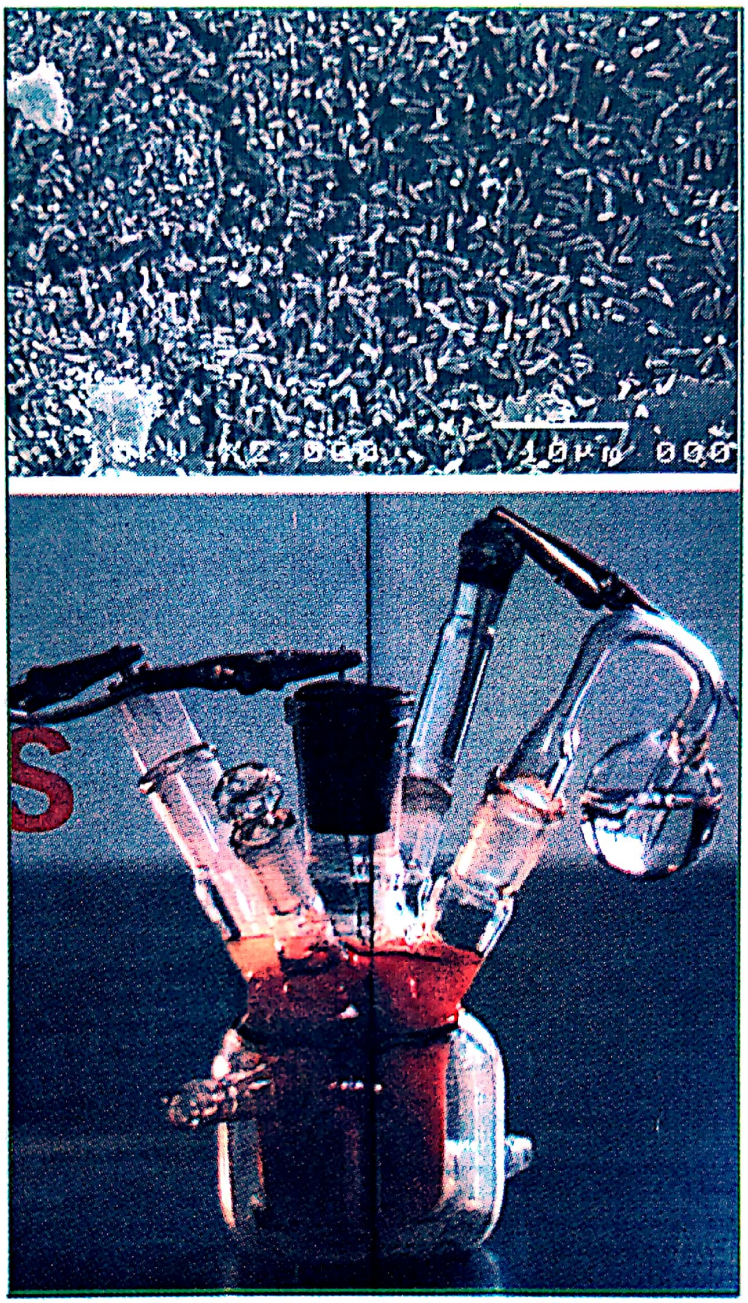


Fig. 194 – Biopila lui Uwe Schröder.
Culoarea orange reprezintă materialul bacteriologic care produce un curent continuu de 1,5 mA/cm2 cu o tensiune de 0,2 V, un record în materie.
Anodul biopilei sale este colonizat de milioane de bacterii aparţinând speciei *Geobacter sulfur reducens*, care au capacitatea de a se debarasa de electronii lor supranumeroşi, creând fluxul de electroni şi, deci, curentul electric

Datele tehnice asupra modului de producere a curentului în biopile le găsiţi în întregime în lucrarea publicată de Uwe Schröder în revista „Science et vie" din octombrie 2003.

În cele ce urmează vă prezentăm în tabelul 195 cele două piste utilizate pentru producerea de biocurent, iar în figura 196 o schemă a producerii bacteriene a curentului electric.

Scanned with OKEN Scanner

Două piste pentru producerea de biocurent electric

	Utilizând bacterii fermentative	Utilizând bacterii reductoare ale metalului
Specia bacteriană	Escherichia coli	Geobacter sulfur reducens
Mobilitatea electronilor	Rămân fixaţi în interiorul celulelor sau sunt captaţi	Cedează electronii lor electrozilor
Randament	Având un mare randament metabolic, bacteriile produc o mare cantitate de electroni şi, de aceea, sunt suficienţi electrozii mici	Randamentul metabolic este redus; produc puţini electroni şi în consecinţă sunt necesari electrozi mari
Natura electrozilor	Conţin platină şi un intermediar chimic pentru captarea electornilor din bacterie	Electrod simplu din grafit
Producţie de curent	Record: 1,5 mA/cm² de electrod la o tensiune de 0,2 V	Record de 16 mA/cm² de electrod la o tensiune de 0,33 V
Diverse	Electrodul este poluat progresiv de subprodusele de oxidare ale materiei organice, cum ar fi monoxidul de carbon.	Întreţinerea electrodului nu este necesară.

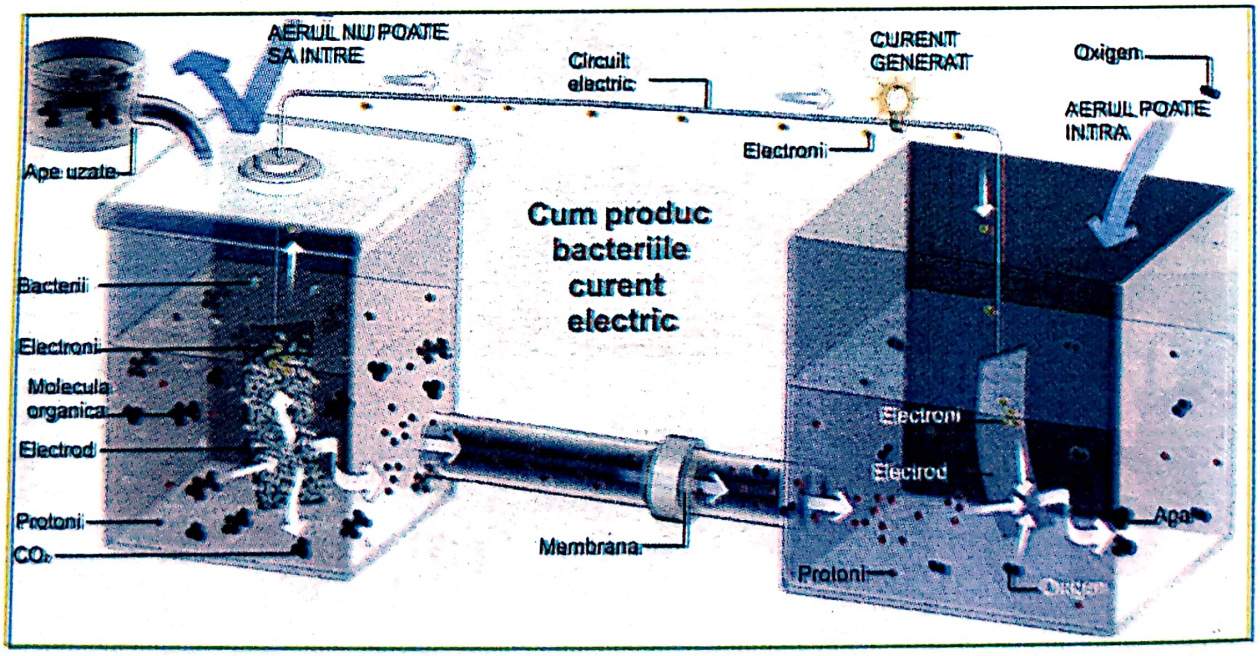


Fig. 196 – Construcţia unei pile bacteriene

S-au observat două specii de bacterii care pot produce curent. Una folosind pe *Escherichia coli*, care, datorită unui metabolism activ produce mai mulţi electroni, dar cu dificultăţi şi costuri mai mari de recuperare a acestora, am putea spune cu dificultăţi de distribuire şi a doua categorie de bacterii din genul *Geobacter* sau *Schewanella*,

Scanned with OKEN Scanner

înzestrate cu enzime de suprafață, specializate în distribuția electronilor către ioni metalici. Adică, sunt bacterii reducătoare ale metalelor. Pornind de la aceste două constatări, doi cercetători americani: Clare Raimers, de la Centrul de Studii Maritime al Universității Oregon și Leonard Tender de la Laboratorul de Studii Navale din Washington au reușit să transforme, în 1999, sedimentele oceanice în veritabile centrale electrice. Pentru aceasta s-au folosit pe de-o parte straturi profunde, lipsite de oxigen și straturi superficiale oxigenate, realizându-se o biopilă mamut (după modelul din figura 196) care le-a pus la dispoziție energie pe întreaga perioadă a cercetărilor.

Cele două categorii de bacterii au avantaje și dezavantaje. Pentru a prelua numai avantajele fiecărui sistem se apelează din nou la biotehnologia moleculară, sperându-se a se obține în curând un microorganism foarte eficace, care să preia avantajele celor două și să elimine dezavantajele. Acest lucru se apropie însă de proiectul lui Craig Venter, dar nu pe domeniul producerii de Hidrogen H^+ ci pe cel al obținerii de electroni e^-. În primul caz este folosit protonul H^+, transformat în molecula H_2, în cel de-al doilea caz electronii direct.

Pilele biologice vor apărea în curând pe piață, înlocuind pe cele clasice peste tot, de la telefoane mobile la pacemaker-uri, unde cercetătorii se debarasează de bacterii utilizând numai enzimele lor care obțin curentul prin degradarea glucozei din sânge. Pilele enzimatice nu se regenează ca cele bacteriene și de aceea enzima trebuie și ea injectată periodic în sânge.

Ce așteptăm pe termen mediu și lung

Primele biopile de talie impozantă vor echipa locațiile industriei agroalimentare sau ale stațiilor de epurare. Avantajul constă în faptul că pilele vor produce curent electric datorită compoziției ridicate a apelor reziduale în materiale organice, dar în același timp va avea loc și o purificare a lor. Acest lucru se va întâmpla în anul 2008.

În perioada 2010-2015 pilele electrice miniaturizate vor pătrunde în viața particulară, vor înlocui acumulatoarele automobilelor. Există cercetători, precum Stuart Wilkinson de la Universitatea din Florida de Sud care își imaginează crearea unor roboți autonomi, capabili de a-și face plinul de energie prin ingerarea de hrană autentică și de a efectua cele mai diferite activități. Aceasta este însă o perspectivă mai îndepărtată.

Ceea ce am prezentat mai sus în materie de energie a viitorului nu este din ciclul SF. Sunt deja rezultatele parțiale ale unor proiecte de cercetare în plină desfășurare căci știința, mai ales în materie de biotehnologie, pare a nu mai putea fi îngrădită. Este foarte bine, dar poate fi și rău. Aceasta este o altă față a medaliei care necesită studii speciale.

Un lucru este sigur. Dacă politicienii vor ține cont de aceste excelente decoperiri ale științei, energia viitorului va fi asigurată, oricât de mare va fi populația globului. Aceasta nu înseamnă că problemele globale actuale vor dispărea. Acest lucru nu se va întâmpla pentru că societatea umană este încă prea tânără evolutiv și deci prea tânără din punct de vedere al stabilității genetice și sociale.

Scanned with OKEN Scanner

De aici, lipsa de solidaritate şi predispoziţia spre conflicte. Există puţine speranţe în maturizarea societăţii umane înaintea declanşării conflictelor majore care o vor distruge, în ciuda inteligenţei formidabile a cercetătorilor şi a epocalelor descoperiri în slujba salvării omenirii.

3.9.2. Pe scurt despre alte utilizări industriale ale biotehnologiilor genetice

Am arătat deja mai sus că biotehnologiile genetice industriale au ca scop înlocuirea produselor din petrol cu produse similare dar create prin transformarea bacteriilor şi a plantelor. Aceste noi tehnologii (conform afirmaţiilor lui Geoffrey Carr în revista „Lumea" în 2004, pag. 69) se pot transforma într-o afacere de peste o mie de miliarde USD. În afara domeniilor amintite până în prezent, bacteriile modificate genetic încep să fie puse la lucru în următoarele domenii:

– În industria materialelor plastice - deja companiile americane Du Pont şi Cargill-Dow realizează fibre obţinute gentehnologic din care pot fi ţesute diferite materiale. Aceste fibre sunt polimeri, adică formate din lanţuri de molecule mici cunoscute ca monomeri. Materia primă prelucrată de bacteriile transgenice este glucoza. Microorganismele transgenice au fost alcătuite după modelul Craig Venter, adică prin specializarea superioară a unor bacterii care deţin aceste proprietăţi de polimerizare a hidraţilor de carbon. Afirmaţia lui Geoffrey Carr cum că firmele mai sus amintite ar utiliza „gândaci" care fabrică monomerii şi apoi îi transformă în polimeri este hilară. Aşa ceva nu există, şi nici nu va exista vreodată pentru simplul motiv că polimerizarea este catalizată de enzime, iar enzimele sunt fabricate de bacterii şi nu de insecte.

Până la apariţia hidrogenului ca principal material energetic prezentat în capitolul anterior, este foarte adevărat că numeroşi cercetători au încercat şi încearcă crearea unor microorganisme transgenice superspecializate care să producă cantităţi foarte mari de enzime degradabile ale celulozei care să transforme această polizaharidă extrem de complexă şi care se găseşte în tot materialul organic al biomasei terestre, ca suport scheletic în zaharuri simple de tip zaharide şi monozaharide foarte utile ca materii prime atât fabricării de mase plastice cât şi pentru fabricarea unor valoroşi combustibili nepoluanţi folosiţi larg astăzi în lume, cum ar fi etanolul.

Tehnologii de fabricare a unor hidrocarburi pornind de la polizaharide şi aminoacizi prin recombinări catalitice speciale sunt de asemenea posibile. Unele din aceste metode zac deja în sertarele marilor laboratoare biotehnologice, aşteptând epuizarea rezervelor de petrol pentru a putea naşte bioreactoarele viitorului. Nu va fi materie organică care să mai polueze zonele agricole şi rurale, totul va putea fi reciclat în biorectoare în substanţe utile în diferite feluri, iar poluarea va începe să dispară. Ar fi foarte important şi util ca societatea românească să reziste până atunci. ■

Scanned with OKEN Scanner

4. TEHNOLOGIILE GENETICE ÎN AGRICULTURĂ

Unul dintre cele mai controversate domenii de activitate umană unde omul ar avea interese directe cu caracter economic şi de mediu îl constituie agricultura. De mai multă vreme cercetătorii lucrează asiduu la cunoaşterea genomului celor mai importante plante şi animale tocmai pentru a găsi cele mai potrivite tehnici genetice pentru îmbunătăţirea producţiei, atât din punct de vedere cantitativ cât şi calitativ.

Aceste organisme care au primit „anumite gene" utile în scopul îmbunătăţirii performanţei lor economice sunt denumite Organisme Modificate Genetic (OMG), iar prezenţa lor în sistemele de producţie agricolă necesită azi intense discuţii şi comentarii care au condus chiar la unele conflicte între SUA şi UE (îndeosebi Germania). Natura acestor conflicte va fi discutată către sfârşitul acestei lucrări. ■

4.1. UTILIZAREA TEHNICILOR GENETICE ÎN FERMELE DE ANIMALE

Într-o mare paletă de activităţi, tehnicile genetice sunt astăzi folosite uzual, devenind un element tehnologic de rutină pentru animalele utile de fermă. Foarte răspândite sunt vaccinurile şi hormonii de creştere obţinuţi prin aceleaşi proceduri ca la oameni. Pe de altă parte, există astăzi gene utile, gene bune, care poartă alelele îmbunătăţirii oricărei forme de producţie la animale. Vom enumera câteva dintre ele:

a) Gene transferabile (transgene) care provoacă obţinerea unei lâni de mai bună calitate la oi.
b) Gene care pot induce la porc obţinerea unei cantităţi mai mari de carne macră şi mai redusă de grăsime.
c) Gene care provoacă o creştere mai accelerată a vacilor de lapte şi scurtarea perioadei de intrare în lactaţie.
d) Cercetătorii au identificat şi clonat o genă care la anumite rase de vite poate stimula creşterea muşchilor. Această genă poate fi transferată la alte rase de bovine sau chiar la oi de carne provocând o creştere mai accelerată a cărnii macre sărace în grăsimi.
e) S-au creat animale modificate genetic care la nivel de fermă au devenit „adevărate fabrici farmaceutice" deoarece acestora li s-au indus anumite gene care produc substanţe biologice rare, greu de găsit şi fabricat pe altă cale. Substanţa respectivă este o proteină, un hormon, un factor de purificare a sângelui, codificat de o genă specifică care a fost transferată în genomul unui animal care îl fabrică şi care îl depozitează apoi în lapte. Medicamentul în cauză (proteina, hormonul, factorul de purificare al sângelui) poate fi preluat de către om prin ingerarea unui pahar de lapte, cantitatea în lapte fiind bine dozată. Producerea pe această cale a medicamentului foarte căutat este mult mai uşoară decât dacă acesta este obţinut prin culturi de celule sau plante transgenice,

Scanned with OKEN Scanner

în care caz purificarea costă foarte mult. Animalele care produc asemenea medicamente sunt denumite „pharming animals", adică pur și simplu „animale de fermă" transgenice (fig. 197).

Fig. 197 – Animale de fermă transgene.
Oile din figură au implementate o genă care codează o proteină sanguină umană pe care o fabrică și o secretă în lapte. Această proteină inhibă o altă proteină care dacă este prezentă în sânge provoacă daune la pacienții cu fibroză chistică și alte boli cronice ale căilor respiratorii. Tratamentul se poate face fie prin consumarea laptelui, fie prin izolarea ei din lapte (procedeu relativ simplu) urmată de purificare. Ea este testată în momentul de față pe oameni pentru combaterea fibrozei chistice (*ilustrație după Campbell Neil/Jane B. Reece - Biologie, 2003*)

Aceste proteine umane obținute prin sistemul pharming, adică în ferme, pot și sunt cel mai adesea identice cu proteinele umane naturale, adică cele produse de organismul uman. Acest lucru nu se întâmplă însă 100%.Testarea de detaliu este necesară tocmai datorită faptului că în unele cazuri și la unii pacienți, există diferențe mici sau modificări neesențiale în structura proteinelor care sunt însă insuficiente pentru apariția unor reacții alergice sau a altor efecte secundare. Utilizarea animalelor în scopul obținerii de medicamente mai este strâns condiționată de sănătatea și igiena animalelor de fermă. ■

4.2. OBȚINEREA ANIMALELOR TRANSGENICE

Se realizează conform schemei din figura 198.

Gena dorită va fi obținută prin clonare (enzime de restricție + secvenționare + sondă hibridizare + gel electroforeză) și va fi injectată în nucleul unei celule ou (zigot) după ce ovulul a fost fecundat *in vitro*. Cel puțin un număr de celule vor îngloba în ADN-ul lor și gena de interes sau dorită.

Scanned with OKEN Scanner

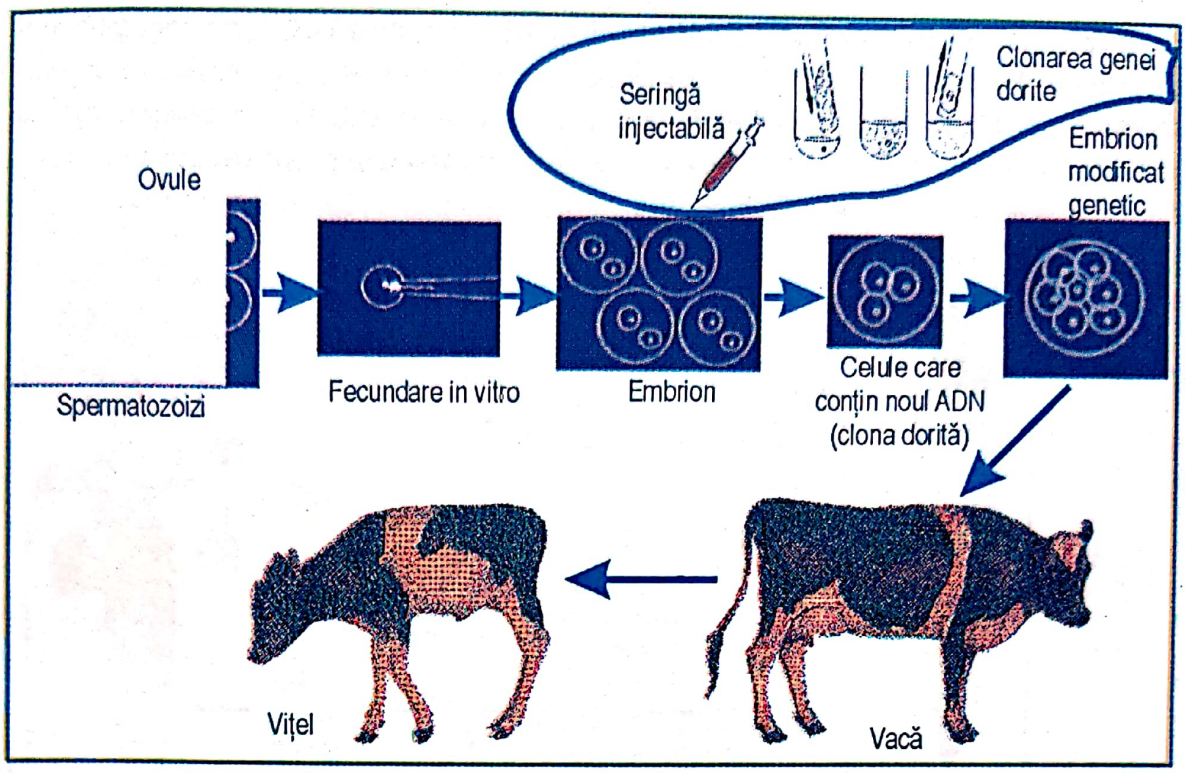


Fig. 198 – Modul de transfer al genei medicamentoase într-un animal de fermă. Se recoltează un ovul feminin şi se fecundează in vitro. În paralel se clonează gena dorită obținută din alt organism prin unul din procedeele cunoscute. Un număr limitat de clone se injectează în nucleul zigotului. Prin înmulțirea celulelor embrionare unele preiau şi ADN-ul străin în propriul lor genom şi lasă să se exprime şi gena străină. Ovulul modificat genetic este implementat în uterul unui animal purtător şi dacă se va dezvolta cu succes se va naşte un animal transgenic, care va purta şi gena unui al treilea organism (*ilustrație după Berca M., 2003*)

Când embrionul ajunge la vârsta de 6-8 zile este implantat în uterul unei femele purtătoare, unde, dacă se va dezvolta normal va da naştere unuia sau mai multor animale transgenice care, pe lângă materialul genetic al celor doi părinți vor deține şi una sau mai multe gene de la un al treilea organism.

De mai multă vreme tehnologiile genetice sunt folosite în îmbunătățirea reproducției animalelor, a creşterii producției de lapte şi a conținutului în grăsimi. Tot tehnologiile genetice stau acum la baza elaborării unor metode, a unor inhibitori ai formării prionelor mutante, acelea găsite vinovate de declanşarea celei mai teribile boli a sfârşitului secolului XX în lumea bovinelor, şi anume encefalita bovină spongiformă, care momentan este numai la începutul declanşării uneia dintre cele mai mari catastrofe ecologice. ■

4.3. UTILIZAREA TEHNOLOGIILOR GENETICE LA PLANTE

Activitatea de cercetare în domeniul pregătirii plantelor utile pentru a accepta tehnologiile genetice s-a concentrat pe două direcții importante:

1. Cunoaşterea cât mai completă a genomului plantelor;
2. Identificarea unui sortiment de gene pentru inducerea caracterelor dorite la diferite specii şi soiuri de plante utile.

Scanned with OKEN Scanner

Într-un fel se poate afirma că pentru unele plante se pretează a fi regenerate pornind de la ţesutul acesteia. Acest lucru s-a întâmplat şi în ţara noastră, îndeosebi la Institutul de Pomicultură de la Mărăcineni, unde prin clonarea ţesuturilor se poate ajunge la obţinerea unor plante libere de viroze sau alte boli cu caractere productive valoroase, cu condiţia ca ţesuturile să fie recoltate de la plante care nu au aceste boli (fig. 199).

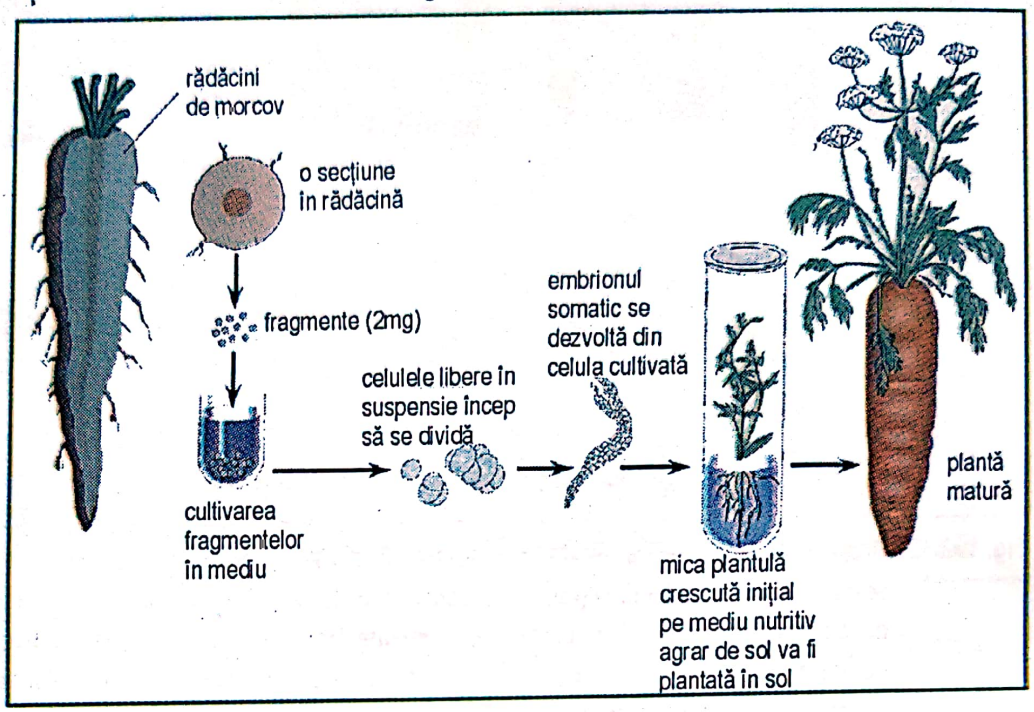


Fig. 199 – Înmulţirea prin clonare a plantelor de morcov.
Americanul Steward F.C. şi colaboratorii săi au demonstrat experimental încă din 1950 că unele plante (în cazul de faţă morcovi) pot fi obţinute din celule somatice, adică celule nereproductive. Aceste produse nu reprezintă altceva din punct de vedere genetic decât o duplicare, dedublare, adică o clonă a părinţilor plantei. Metoda se aplică în practică numai când planta de pornire este un exemplar de excepţie care se cere multiplicat pentru valoarea indivizilor săi. Metoda nu aduce o îmbunătăţire a descendenţilor, dar are avantajul că executându-se în laborator şi sere fereşte tinerele plante îndeosebi de infecţii cu virusuri şi ciuperci, inerente în condiţii de câmp (*prelucrare după Campbell N., 2000*)

Asemenea cercetări, dar şi realizări practice au fost obţinute îndeosebi în domeniul pomiculturii, cunoscute fiind realizările mai ales la arbuşti, pomi şi căpşuni, ale Institutului de Cercetări de la Mărăcineni şi ale staţiunilor din subordinea sa.

Tehnicile genetice utilizate pentru transferul unor gene valoroase, dorite, sunt în mare cele cunoscute, la care însă trebuie să precizăm următoarele:

1) Vectorul folosit pentru introducerea genei dorite în celulele plantelor este cel mai adesea un plasmid, care se extrage din bacteria de sol ***„Agrobacterium tumefaciens"*** pe care am prezentat-o într-un capitol anterior.
Plasmidul II - căci aşa a fost denumit, îşi trage numele de la Tumori (T) pentru că în natură, în toate plantele infectate a produs tumori, în unele cazuri mai ales pe rădăcini producând un fel de g.g. (gale, gâtuite). Ti-plasmidul îşi sintetizează un segment din ADN-ul său, denumit T-ADN în ADN-ul cromozomal al

Scanned with OKEN Scanner

plantei sale gazdă. Pentru folosirea ca vector a acestui plasmid, cercetătorii operează cu o versiune a acestuia, care nu provoacă boala.

2) Gena străină dorită (gena de interes) este înglobată prin metoda cunoscută în Ti-plasmid. În continuare există două variante de lucru:

2a. Plasmidul recombinat este readus în bacteria mamă (*Agrobacterium*) la care apoi sunt injectate celule cultivate ale plantelor, sau

2b. Plasmidul poate să fie strecurat direct în celulele plantelor, unde în final este înglobat în cromozomii plantei.

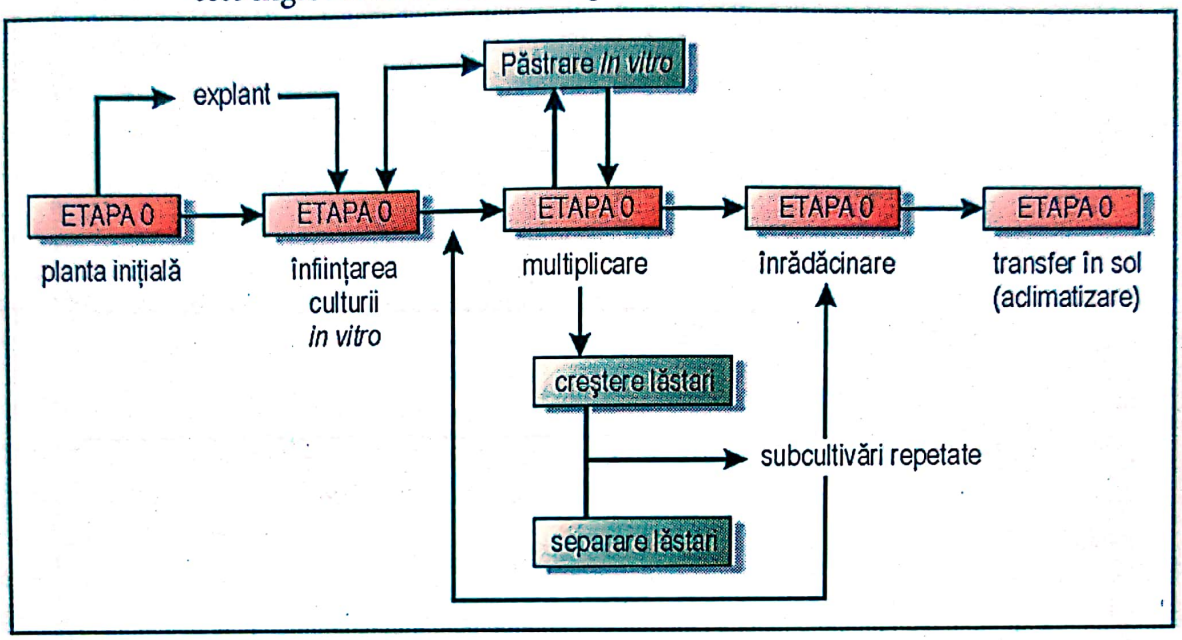


Fig. 200 – Etapele tehnologiei de micropropagare la Institutul de Cercetări pentru Pomicultură, Mărăcineni (*Berca M.*). Producția comercială de arbuști fructiferi și căpșuni prin micropropagare (înmulțire vegetativă) se realizează în patru etape, dintre care trei sunt parcurse in vitro iar al patrulea în condiții de seră. La ele s-a adăugat etapa 0. Așadar:
Etapa 0 : pregătirea plantelor sursă de celule.
Etapa I: din meristeme se inițiază cultura *in vitro*.
Etapa a II-a: multiplicarea și alungirea lăstarilor.
Etapa a III-a: înrădăcinarea lăstarilor.
Etapa a IV-a: transferul în sol și adaptarea la noile condiții (*Botu Ioan și colab., Catalog de soiuri și material săditor pomicol, Editura Ceres, 2002*)

Oricare dintre variante este posibilă tocmai datorită faptului prezentat și în figura 199, că plantele au avantajul unei regenerări complete pornind de la celule modificate genetic, planta regenerată preia gena care se exprimă pentru caracterul deținut de genă și care în continuare îl transmite descendenților genetici. Prezentarea schematică a acestei tehnologii se regăsește în figura 201.

Utilizarea Ti-plasmidului ca vector are și un mare dezavantaj, și anume acela că el poate fi utilizat numai la plantele dicotiledonate, pentru că numai acestea pot fi infectate de *Agrobacterium*. Numeroase plante aparținând unor culturi foarte utile precum monocotilele porumb și grâu nu pot fi injectate și ca atare metoda nu poate fi aplicată.

Scanned with OKEN Scanner

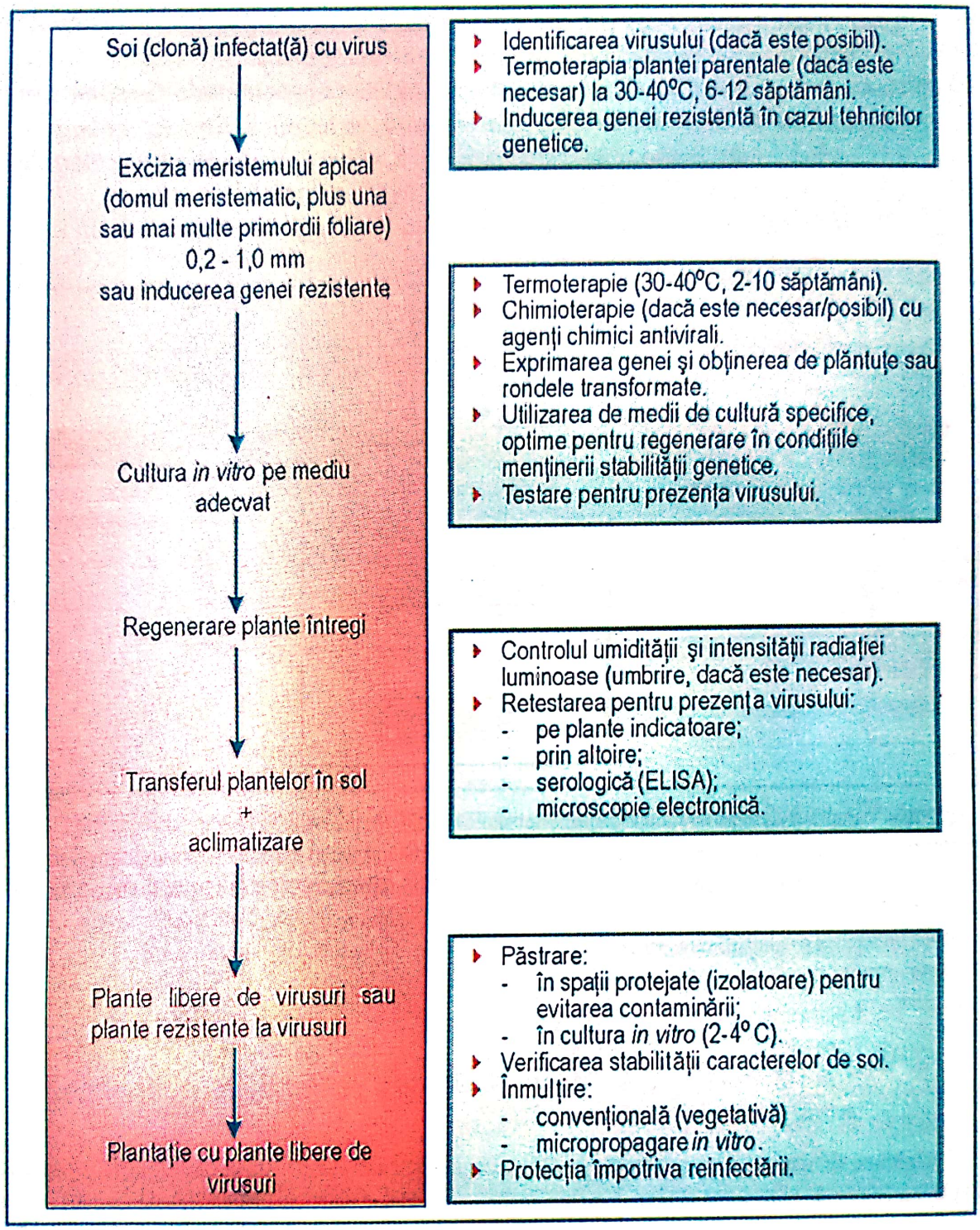


Fig. 201 – Schemă de producere a plantelor libere de virusuri prin culturi de meristeme sau ţesuturi. Metoda se aplică şi pentru regenerarea plantelor rezistente la virusuri după inducerea acesteia prin tehnologii genetice (vezi subcapitolul Inducerea rezistenţei la virusuri) (*prelucrat după Botu Ioan şi colab., Ceres, 2002*)

Tehnicile de reproducere vegetativă nu pot induce rezistenţa la virusuri aşa cum se poate întâmpla în cazul creării plantelor transgenice. În schimb, crearea plantelor transgenice după inducerea rezistenţei se face tot prin transfer vegetativ (fig. 202).

Scanned with OKEN Scanner

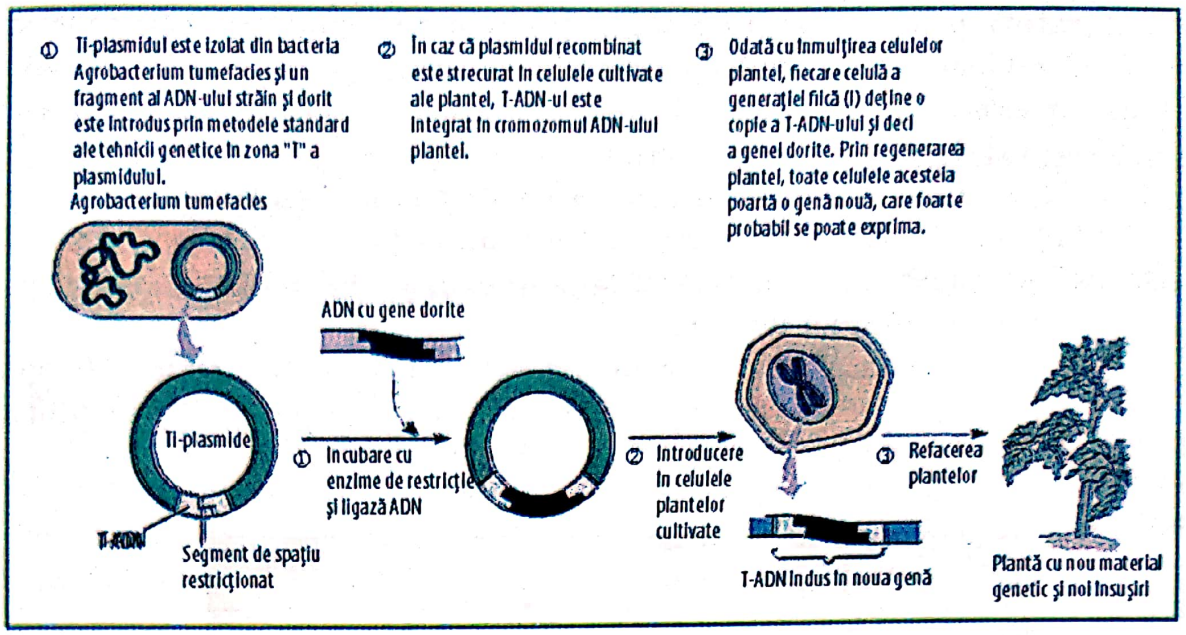


Fig. 202 – Folosirea T-plasmidelor ca vector pentru manipularea genetică a plantelor (*după Neil A. Campbell și Jane B. Reece, 2003*)

Pentru aceste din urmă plante, cercetătorii dispun de soluții tehnice alternative cum ar fi electroporația și bombardarea cu gloanțe ADN, despre care am scris deja (vezi fig. 161).

Tehnicile genetice înlocuiesc cu mare viteză programele tradiționale de ameliorare a plantelor, de creare de noi soiuri, mai ales pentru situațiile în care unele caractere dorite depind numai de una sau câteva gene.

În ultimii ani, agricultorii americani au cultivat atât soia cât și porumb modificate genetic pe aproape jumătate din suprafața planificată, urmărindu-se în principal următoarele obiective (în acest moment în lume se cultivă peste 50 milioane ha cu plante modificate genetic).

a) Inducerea rezistenței la unele erbicide cu acțiune totală în vederea reducerii numărului de fitocide din ecosistemele agricole.

b) Inducerea rezistenței la unii dăunători (greu de combătut prin mijloace chimice cum ar fi *Ostrinia sp, Diabrotica virgifera*), precum și inducerea rezistenței la unele boli, îndeosebi la cele virotice și bacteriene. În acest sens, un program pentru controlul uneia din cele mai periculoase bacterioze a pomilor, *Erwinia amilovlora* (gutui, păr, măr) cu deosebire în Europa, este în curs de desfășurare. Combaterea gândacului din Colorado la cartof (*Leptinotarsa decemlineata*) este realizată tehnologic, dar unele efecte secundare nedorite o fac să fie relativ puțin extinsă.

c) Inducerea unor gene care îmbunătățesc calitatea nutritivă a recoltelor. De exemplu, atât la porumb cât și la orez au fost create soiuri transgenice care dețin secvențe ADN ce măresc conținutul în caroten (provitamina A), o substanță care blochează radicalii liberi și protejază organismul omului și al animalelor de unele îmbolnăviri grave.

În același timp, tot prin implementarea unor gene s-au obținut hibrizi de porumb și soiuri de orez, la comandă, fie mai bogați în grăsimi pentru

Scanned with OKEN Scanner

nutriția puilor de carne, fie mai bogați în proteine pentru nutriția porcilor. Orezul îmbunătățit nutrițional, mai ales în vitamina A, are un efect deosebit, cu profunde implicații sociale pentru cel puțin 50% din populația lumii care depinde hotărâtor de acest aliment primar (fig. 203).

După ce ani de zile, Germania s-a numărat printre țările care au refuzat utilizarea OMG-urilor în agricultură, mai ales în domeniul plantelor, cabinetul guvernului depune în ianuarie 2004, Legea „Tehnologiilor Genetice" care, după toate estimările va fi aprobată.

Fermierii germani sunt nemulțumiți de încetineala cu care se preocupă guvernul german de această problemă, simțindu-se prejudiciați în competiția lor cu cei americani sau cu cei ai altor țări din UE.

Pierderea a încă unui sezon agricol nu-i mulțumește pe aceștia.

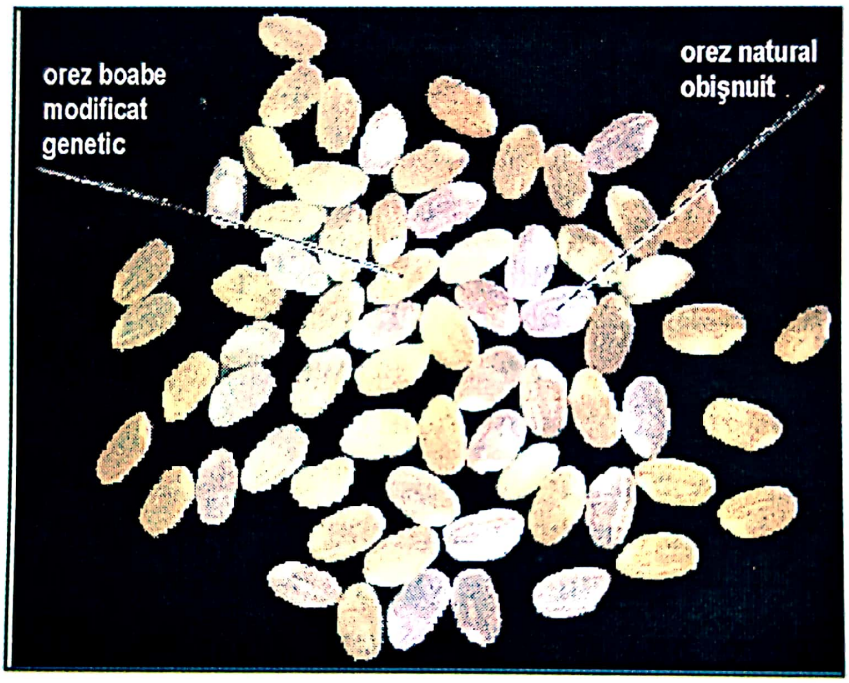


Fig. 203 – Orez galben modificat genetic și orez alb și normal.
Boabele galbene conțin carotina β ca urmare a inducerii în planta de orez a unei gene ce codifică această substanță. Gena provine dintr-o secvență obținută din narcisă și o alta provenită de la o bacterie. Vectorul a fost un plasmid de *Agrobacterium tumefaciens*, deși orezul este o monocotilă (*după Campbell și colab., 2003*)

d) Inducerea unor gene care îmbunătățesc fixarea azotului atmosferic cu avantaje enorme pentru hrănirea populației globului și a reducerii poluării biosferei. Așa cum se știe, fixarea se face fie de către bacterii libere, fie de către bacterii ce trăiesc în simbioză cu leguminoasele sau alte familii de plante. Într-un subcapitol vom trata în detaliu această problemă.

e) Tehnologiile genetice au făcut posibilă și alianța surprinzătoare între agricultură și medicină, respectiv industria farmaceutică. Biotehnologiile genetice au făcut posibilă crearea unor plante care produc proteine medicinale și proteine virale, utilizate apoi ca vaccinuri. Asemenea medicamente denumite „Pharming -

Scanned with OKEN Scanner

producție" sunt astăzi studiate în detaliu în clinici. Rezultatele cele mai importante le reprezintă **vaccinurile împotriva hepatitei B** și un **anticorp** produs de un tutun transgenic care inhibă **creșterea bacteriilor** care provoacă carii dentare. Cantități mari din aceste produse pot fi obținute mai economic în plante decât în culturi celulare. ■

4.3.1. *Metode fizice și biologice recunoscute și utilate în transferul genelor la plante*

Am prezentat deja două metode folosite foarte frecvent în transferul genelor la plante. Este vorba de utilizarea Ti-plasmidelor, ca metodă biologică folosită îndeosebi la plantele dicotile și cea a bombardării cu microproiectile ADN, folosite dominant la monocotile. Mai există și alte metode cunoscute generic ca metode de transformare genetică a plantelor care au fost aprobate sau sunt în curs de testare. În sinteză, ele sunt înscrise în tabelul 204.

Tabelul 204

Metodologii de transfer al ADN-ului dorit în plante în vederea modificărilor genetice

Metoda	Explicații
1. Transferul genelor cu ajutorul Ti-plasmidelor	Este un sistem excelent și foarte eficace, dar care se limitează cu prioritate la clasa de plante dicotile. În unele cazuri foarte rare se folosește și la monocotile - orez îndeosebi.
2. Bombardament cu microproiectile ADN	Se utilizează pentru numeroase plante și țesuturi de plante. Sistemul este simplu și economic, însă este nepotrivit pentru integrarea stabilă a ADN-ului în cromozom.
3. Vectori virali	Nu este potrivit pentru transferul ADN în celulele plantelor superioare, se potrivește mai bine bacteriilor și unor plante inferioare.
4. Transfer direct în protoplastele plantelor	Se utilizează numai la protoplastele plantelor, acestea contribuind apoi la regenerarea plantei. (În acest caz, protoplastul reprezintă o celulă a plantei al cărei perete, membrană a fost îndepărtată chimic sau enzimatic).
5. Microinjectare	Este utilizată numai condiționat, deoarece o celulă poate fi injectată o singură dată. Solicită o mare precizie tehnică.
6. Electroporație	Este utilizată numai la celulele plantelor care dețin capacitatea de a regenera planta în întregime.
7. Amestecarea și contopirea liposomilor	Se aplică în aceleași condiții ca la punctul 6.

Unele metode nedescrise în detaliu până în prezent, cum sunt cele de la pozițiile 4,5 și 6, se utilizează în sistem folosind numai protoplastele, adică întregul material celular, rezultat după îndepărtarea peretelui lor în general pe cale enzimatică sau chimică. Aceste protoplaste pot fi menținute în culturi pe medii speciale ca celule independente iar după transformarea genetică, calitatea mediului de cultură le favorizează formarea țesuturilor și transformarea lor prin regenerare în plante întregi (vezi fig. 202).

Din cele șapte metode prezentate în tabel, cei mai numeroși cercetători preferă cele două metode prezentate deja mai sus și anume:

Scanned with OKEN Scanner

- transferul ADN în celulele plantelor cu ajutorul Ti-plasmidelor obținute din *Agrobacterium tumefaciens.*
- Bombardarea cu microproiectile. ■

4.3.1.1. Obținerea cu ajutorul tehnologiilor genetice a unor noi soiuri și hibrizi de plante

Această temă este foarte serios luată în considerare atât de biotehnologii care folosesc tehnicile genetice cât și de cercetătorii agronomi ca și de marii cultivatori. Obținerea unui soi aparținând unei plante de cultură ca și a unui hibrid durează o perioadă lungă de timp, necesară selecției antropice a unor mutații induse pe diferite căi. Or, tehnicile genetice sunt în măsură să elimine munca uneori de o viață a cercetătorilor pentru a obține caracterele dorite ale unui soi. Tehnologiile genetice în acest sens se concentrează așa cum am spus pe următoarele domenii:

a) Dezvoltarea unor soiuri cu un potențial ridicat de producție.
b) Mărirea și optimizarea conținutului nutrițional al recoltelor.
c) Crearea unor soiuri sau hibrizi de plante de cultură rezistente la:
   - insecte
   - virusuri
   - erbicide
   - stresuri diferite cauzate de factorii de mediu.
d) Proiecte care își propun modificarea sistemului de schimb de substanțe care să influențeze pigmentarea respectiv coloritul florilor, modificarea produselor obținute de plante sau pur și simplu utilizarea plantelor ca bioreactori.

4.3.1.1.1. Inducerea rezistenței plantelor la insecte

Dezvoltarea unui proiect care să-și propună eliminarea utilizării insecticidelor din sistemul de protecție al culturilor a avut la bază două elemente de bază:

1. Eliminarea din tehnologiile agricole, fie și parțial, a celor mai toxice produse de protecția plantelor - insecticidele.
2. Reducerea semnificativă a costurilor și ecologizarea sistemelor de producție agricolă.

În spatele acestui proiect stă ideea modificării genetice a plantei de cultură de o asemenea manieră încât prin funcțiile sale să producă suficient insecticid - pentru a se autoapăra, dar nu prea mult pentru a nu deveni ea însăși periculoasă pentru mediu și pentru fabricarea alimentelor.

În aproape 20 de ani de cercetare au fost elaborate două strategii privind inducerea rezistenței plantelor la dăunători și anume:

1) Depistarea și folosirea unei gene pentru protoxinul* unui insecticid produs de o subspecie a lui *Bacillus turigiensis.*
2) Utilizarea și folosirea unei gene pentru inhibarea proteazei care s-a dovedit a fi activă la diferite insecte. În fond, prin inhibarea proteazei insectelor le sunt eliminate multe din funcțiile care le fac paraziți ai plantelor.

* Protoxinul mai este denumit și B.t-toxină și reprezintă o proteină insecticidă obținută din Bacillus turigiensis în timpul formării sporilor (endosporilor).

Scanned with OKEN Scanner

În ciuda a numeroase afirmații, nefondate științific, protoxinul lui *Bacillus turigiensis* nu rămâne deloc în mediu și nici nu se transmite pe lanțul trofic alimentar (conform lui Bernard R. Glieck și Jack F. Pasternak, 1995).

Cercetări recente au arătat însă că există pericolul ca protoxinul să aducă anumite daune unor insecte utile și să transmită unele reziduuri în boabele cerealelor, dar și în pulpa cartofului.

Dacă ne însușim termenul de organisme modificate genetic (OMG) și trebuie să acceptăm acest termen foarte larg utilizat, atunci putem considera protoxinul genei *Bacillus turigiensis* ca un OMG de generația I insuficient purificat genetic care nu a prins suprafețe mari, mai ales în Europa. De fapt, gena proteinei insecticid a lui *Bacillus turigiensis*, subspecia Kurstaki, nu se poate exprima în plante foarte bine. ■

4.3.1.1.2 Dezavantajele sistemului

1) Exprimarea redusă a genei face ca protecția plantei împotriva insectelor să fie adesea incompletă. Pentru mărirea expresiei genei cercetătorii și-au propus să scurteze gena, care deține un material genetic inutil, mult prea mare (și care ar putea fi cauza unei expresii reduse) și: a) să sintetizeze numai partea aminoterminală a toxinei la care b) se adaugă introducerea unui promotor puternic în celula plantei care să coordoneze expresia genei. Aceste două metode au condus la creșterea ușoară a cantității de toxină produsă în plantă, însă insuficientă pentru stabilizarea protecției.

Pentru eliminarea acestui dezavantaj, cercetătorii au căutat în continuare mărirea capacității de expresie a genei și au depistat **alte secvențe minimale** care codifică activitatea toxică. Pentru aceasta s-au comparat secvențele aminoacizilor protoxinici ai mai multor tulpini de *Bacillus turigiensis* pentru a se defini dacă există un domeniu „insecticid activ". Această analiză a demonstrat că partea aminoterminală a moleculei protoxinice este în mod deosebit bine conservată la susa *Bacillus turigiensis* subspecia Kurstaki (aprox. 98%). Dimpotrivă, zona carboxiterminală este extrem de instabilă și variabilă (aprox. 45% conservare).

Adâncirea cercetărilor a arătat că întreaga activitate a insectotoxinei se află pe lungimea primilor 646 aminoacizi ai terminalului N ai protoxinei alcătuită din 1156 aminoacizi.

Secționarea segmentului activ al genei protoxinice, adică aceea care codifică secvența de concentrație înaltă a aminoacizilor + clonarea ei într-o bacterie și inducerea în plante, a demonstrat în laborator că activitatea insecticidă împotriva ordinului Lepidoptera este la fel de mare ca și în cazul implementării genei în forma inițială, de bază. În plus, trebuie să adăugăm că, prin diminuarea materialului genetic nefolositor se reduce incidența unor eventuale efecte secundare necunoscute, dar care constituie punctul forte al atitudinii anti OMG al organizațiilor ecologiste ca și al unor guverne și politicieni.

S-au făcut experiențe pe multe plante, iar în practică există astăzi OMG-uri cu rezistența contra insectelor la culturi ca: **bumbacul, cartoful, porumbul, diferite specii de legume și orez.**

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a se demonstra că gena protoxinică, scurtată, este în măsură să protejeze plantele de insecte s-a indus, s-a transferat această genă plantelor de tomate. Varianta prescurtată a genei sub control transcripţional a „fabricat" un promotor puternic şi constructiv denumit promotorul 35S, care aparţine virusului mozaicului florilor de varză şi care în terminaţia transcripţiei a indus un semnal poliaden-iliric al sintezei de napolin. În fine, acest complex (aparent complicat) a fost clonat în domeniul T-ADN al unui vector Ti-plasmidic cointegrativ (fig. 205).

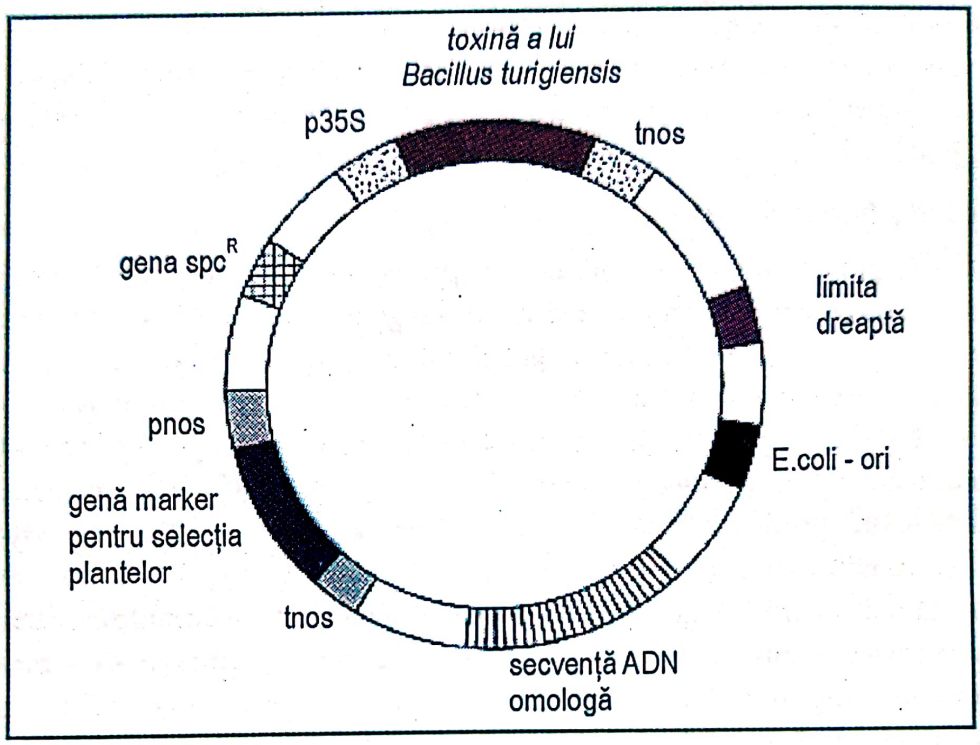


Fig. 205 – Vector de clonare cointegrativ care conţine gena BT.
Gena toxinei se subordonează controlului promotorului 35s foarte puternic constituit (p. 35s) obţinut din virusul mozaicului florilor de varză care dispune de un semnal poliadeniliric al sintezei de napolin (tnos) pentru transcripţia terminaţiei.
Vectorul conţine un punct starter de replicaţie pentru E. coli (ori) şi o genă rezistentă la spectinomicină (spc^R) care permit, pe de o parte, menţinerea stabilităţii, a echilibrului vectorului iar pe de altă parte o selecţie a celulelor de *Escherichia coli*. Vectorul mai conţine o limită reală a T-ADN-ului şi o genă marker pentru selecţie în plante.
Fiind vorba de un vector cointegrativ, deducem că există două plasmide care trebuie integrate, iar pentru acest lucru vectorul conţine o zonă ADN similară, omoloagă Ti-plasmidului de bază. Gena neomiconfosfotransferazei (npt) care serveşte toate plantele cu gene reporter se subordonează controlului transcripţional al secvenţei genei ce codează sinteza napolinei (pnas, tnos).
Pentru selecţie se utilizează celule ale plantelor transformate, rezistente la kanamicină.

La prima vedere, lucrurile par complicate, dar nu şi pentru specialişti, iar noi ne străduim să le facem cât mai explicite pentru un public mai larg preocupat de aceste probleme.

Pentru funcţionalitatea vectorului cointegrativ acesta mai conţine:

– o genă rezistentă la spectinomycină (spc^R) care îi permite să poată fi selecţionată atât în bacteria *Escherichia coli* cât şi în *Agrobacterium tumefaciens*;

Scanned with OKEN Scanner

– un punct de replicare pentru *Escherichia coli*;
– o genă fosfotransferază pentru neomicin, care au fost şi sunt controlate de promotorul sintezei napolinei, semnalele poliadenilirice prin transcripţia terminaţiei.

În felul acesta a fost posibilă selectarea celulelor transformate ale plantei în prezenţa kanamicinei. Vectorul clonat cointegrativ mai conţine:

– limita reală T-ADN aşezată în dreapta plasmidului dintr-un napolin Ti-plasmid;
– un segment al octopin-Ti-plasmidului care deţine un domeniu omolog care permite o recombinare cu un Ti-plasmid fortificat cu care poate fuziona.

S-a construit şi modificat plasmidul în *Escherichia coli* înainte ca acesta să fie introdus într-o suşă de *Agrobacterium tumefaciens*.

După recombinare în *Agrobacterium tumefaciens*, forma scurtată a genei protoxinei este transferată în ADN-ul cromozomal al plantelor de tomate.

Cercetările efectuate cu tomate transgenice cu protoxină scurtată au demonstrat că atât în seră cât şi în câmp exprimarea (a se citit rezistenţa) a fost mai bună împotriva insectelor dăunătoare *Manduca sexta, Heliothiszea* şi mult mai slabă pentru *Keiferia lycopersicela*. Deci, exprimarea a fost completă şi suficientă iar protecţia a fost insuficientă, cu excepţia cazului reprezentat de *Manduca sexta* (vezi tabelul 206).

Tabelul 206

Predispoziţia unor tipuri sălbatice ca şi a tomatelor transgenice la atacul insectelor (după Delann J. şi colab. 1989, Biotechnology nr. 7, 1265-1269)

Insecte	Procentul tomate sălbatice atacate		Procentul tomate transgenice atacate	
	fără insecticid	tratate cu insecticide	fără insecticid	s-au făcut şi tratamente chimice
Manduca sexta	47,5	3,75	1,25	0,0
Heliothis zea	20,1	lipsă date	6,4	lipsă date
Keiferia eycopersicella	99,7	95,1	94,2	80,4

2) Persistenţa unei toxine Bt, insuficient exprimate, conduce uşor la formarea rezistenţei insectelor faţă de aceasta. Am putea spune că este favorizată însăşi formarea unei rezistenţe încrucişate şi multiplă. Rezistenţa a fost semnalată în mod deosebit la trestia de zahăr, în Haway, pe la mijlocul anilor '90. Cam în aceeaşi perioadă a fost semnalată şi în America de Nord la cultura bumbacului. Alarmate, marile concerne producătoare de sămânţă transgenică, pentru a se reduce presiunea de infecţie, au recomandat semănarea în amestec a seminţei modificate genetic cu cea normală pentru ca insectele să-şi exprime agresivitatea asupra celor normale care trebuie tratate chimic. Această soluţie a fost aleasă şi pentru controlul gândacului din Colorado, *Leptinotarsa decemlineata*, ea neavând însă o rezonanţă practică consistentă.

Putem afirma deci că până în acest moment al cercetărilor nu s-a putut obţine o exprimare suficient de convingătoare a genelor Bt încât să putem vorbi de un control eficient al dăunătorilor. De aceea cercetările au trebuit continuate. ■

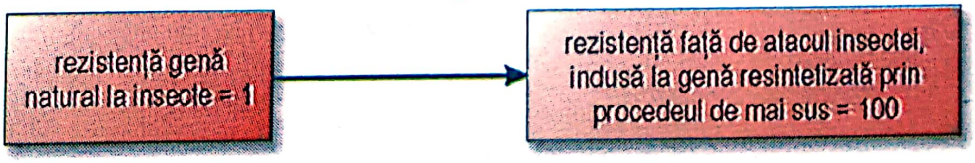
Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

4.3.1.1.3. Noi metode pentru creşterea exprimării genelor protoxinei Bt

S-au încercat în acest sens două metode pe care le-am putea denumi neobişnuite:

1) O primă cercetare a constat în izolarea unei gene care induce toxina contra insectelor şi modificarea ei printr-o mutageneză dirijată, specifică. În paralel, au fost schimbate toate secvenţele ADN care inhibau transcripţia sau translaţia completă în planta gazdă; în experiment s-au folosit tutunul şi tomatele. Această modificare „parţială" a genei deţine o secvenţă nucleotidică care se suprapune pe o lungime de 965 nucleotizi cu tipul sălbatic şi codează practic aceeaşi proteină toxică. Aceste plante transgene care se exprimă prin această secvenţă produc de 100 de ori mai multă proteină toxină ca plantele transformate din tipurile sălbatice.
2) O a doua cercetare are ca idee conceptuală o versiune complet modificată a genei insecto-toxinei printr-o sinteză chimică a acesteia (a genei). Pentru aceasta trebuie luate în considerare următoarele:
   - Gena conţine codoni folosiţi cu precădere de plante şi mai puţin de bacteriile grampozitive.
   - Prin modificarea genei apare posibilitatea suprimării, eliminării structurilor secundare ale mARN ca şi a secvenţelor poliadenilirice, amândouă structurile prin prezenţa lor conducând la reducerea exprimării genei.
   - Plantele modificate genetic, transformate prin inducerea acestui prototoxin, foarte modificate în sensul eficientizării lui, dispun de o capacitate de a produce de circa 100 de ori mai multă toxină decât tipul sălbatic din care a fost recoltată gena rezistenţei deci :



Creşterea cantităţii de protoxină prin sinteză codată genetic în plante s-a corelat strâns cu rezistenţa plantei faţă de insecte. Succesul acestei metode, deşi nu este deplin, lasă totuşi să se înţeleagă că cercetătorii sunt pe drumul cel bun în obţinerea unei metode de inducere a rezistenţei faţă de atacul insectei la un număr cât mai mare de plante. ■

4.4. METODE PENTRU EVITAREA REZISTENŢEI ŞI MĂRIREA SPECTRULUI DE ACŢIUNE

S-a arătat deja că, prezenţa toxinei *Bacillus turigiensis* în permanenţă în plante în concentraţii diferite în funcţie de cantitatea genei implementate constituită după unul din modelele de mai sus, poate conduce la apariţia unor forme de rezistenţă faţă de insecte şi nu faţă de atacul lor, mai ales pentru cele cu o înmulţire densă la care viteza de replicare şi formare a unor gene rezistente este şi ea foarte mare. De aceea, se caută

posibilităţi pentru a evita ca plantele care exprimă gena protoxinei *Bacillus turigiensis* să selecteze insecte rezistente.

1. Prima strategie în acest sens constă în a căuta o soluţie gentehnică prin care expresia insectotoxinei să se manifeste o perioadă scurtă de timp. Pentru aceasta se clonează gena pentru protoxina *Bacillus turigiensis* în direcţia de sus în jos a benzii ADN a unui promotor obţinut de la o genă a tutunului denumită **pathogensis - related protein 1.a gene** (pr - 1.a). Expresia lui pr - 1.a constituie parte a exprimării unui mecanism de apărare care combate agentul unei boli în plantele de tutun. În mod normal gena pr -1.a este indusă de un număr mare de organisme patogene sau de unele substanţe chimice, cum ar fi acidul salicilic sau acidul poliacrilic.

2. Inducerea genei pr -1.a animată chimic are şi un alt avantaj şi anume acela că gena poate fi indusă numai atunci când insecta este prezentă pe plante. Noile descoperiri genetice au condus la obţinerea aşa-numiţilor OMG-uri de generaţia a doua şi despre ele vom vorbi ceva mai departe. Avantajul metodei constă nu numai în evitarea formării de rezistenţă la insecte ci şi în eliminarea efectelor secundare generate de prezenţa permanentă a toxicului în plante. Este deci ideal ca toxicul să apară numai când insecta atacă şi numai în zona în care atacă. Or, acest lucru este astăzi realizat teoretic, urmând ca în curând să fie implementată şi în practică. Metoda mai are avantajul posibilităţii de sinteză a unui număr mult mai mare de alte proteine-toxice în plantele transgene.

3. Caracterul limitat al genei *Bacillus turigiensis* în controlul insectelor face necesară obţinerea altor proteine-toxice, aşa cum am arătat mai sus. Se apelează tot la natură şi se caută gene care să exprime noi combinaţii directe în plante sau care să inducă „inhibitori ai proteazei" care pot fi preluate de insecte la prima hrănire, hrană a căror proteine ingerate nu pot fi hidrolizate iar dăunătorul moare prin înfometare.

Metoda inhibării proteazei face şi ea parte din mecanismele de derulare şi creare a OMG-urilor de generaţia a doua.

4. În depistarea genei de interes în domeniul inhibării proteazei s-a pornit prin a căuta în banca de date cADN a unei clone care codifică inhibitorul tripsinic în mazărea cu bobul lung (cow pea). S-a folosit în acest scop o sondă ADN sintetizată chimic, care a extras din secvenţele de aminoacizi exact pe aceea care codează inhibarea tripsinei (fig. 204).

S-a subclonat apoi întregul cADN într-un vector binar de clonare pe bază de Ti-plasmizi, după care acesta a fost introdus într-o suşă de *Agrobacterium tumefaciens* care conţine un Ti-plasmid atenuat şi care deţine o genă activă - **viv** - (un asemenea plasmid este prezentat în figura 207).

Între graniţele din stânga şi din dreapta ale T-ADN-ului se află o genă neomicin-fosfo-transferază (npt) care se află transcipţional sub controlul semnalelor de sinteză a napolinei (pnos şi tnos) care o şi încadrează. Gena npt astfel controlată poate servi la selecţia plantelor rezistente la kanamicină şi, pe de altă parte, la selecţia inhibitorului de tripsină din specia de mazăre. Controlul formării acestei gene se face asupra terminaţiei transcripţiei de către promotorul 35s (p.35s) obţinut din virusul mozaic al florilor de varză şi al locaţiei poliadenilirice a genei sintezei napolinei.

Scanned with OKEN Scanner

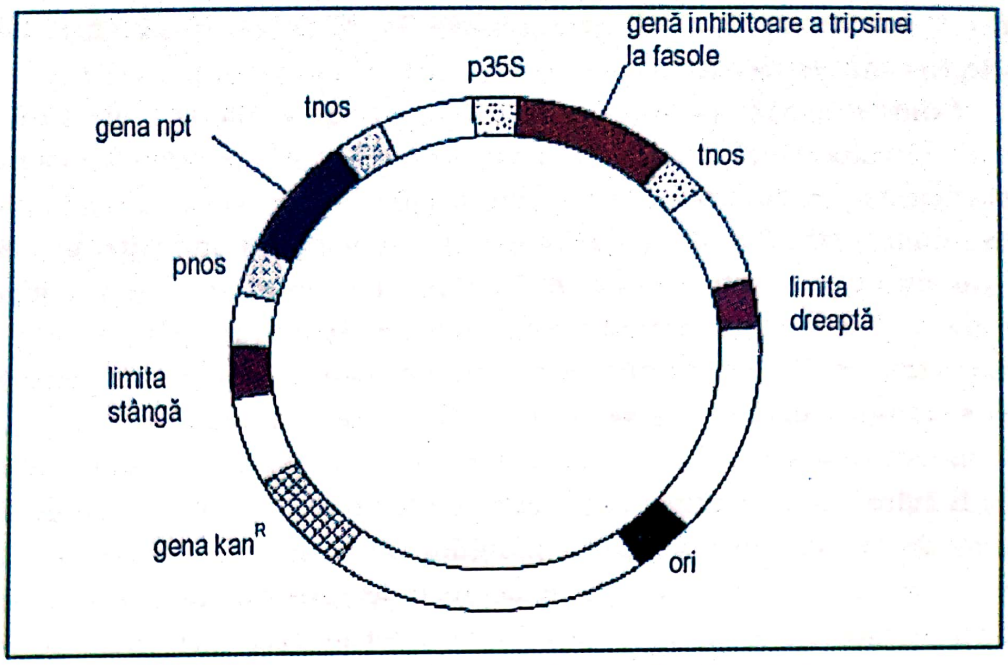


Fig. 207 – Clonarea binară a unui vector care conţine gena ce codează inhibitorul tripsinei. Această genă a fost extrasă dintr-o specie de Thascalus. Vectorul deţine un punct de replicare al ADN-ului (ori), pentru a putea avea o mare capacitate de alegere a gazdei şi a unei gene rezistente la kanamicină (kan^R). Aceasta poate fi utilizată atât în *Escherichia coli* cât şi în *Agrobacterium tumefaciens*.

Tripsina (fig. 208) este o enzimă care favorizează digestia. Or, crearea unui atare inhibitor în plantă face ca tripsina să lipsească, digestia să nu se producă şi insecta să moară.

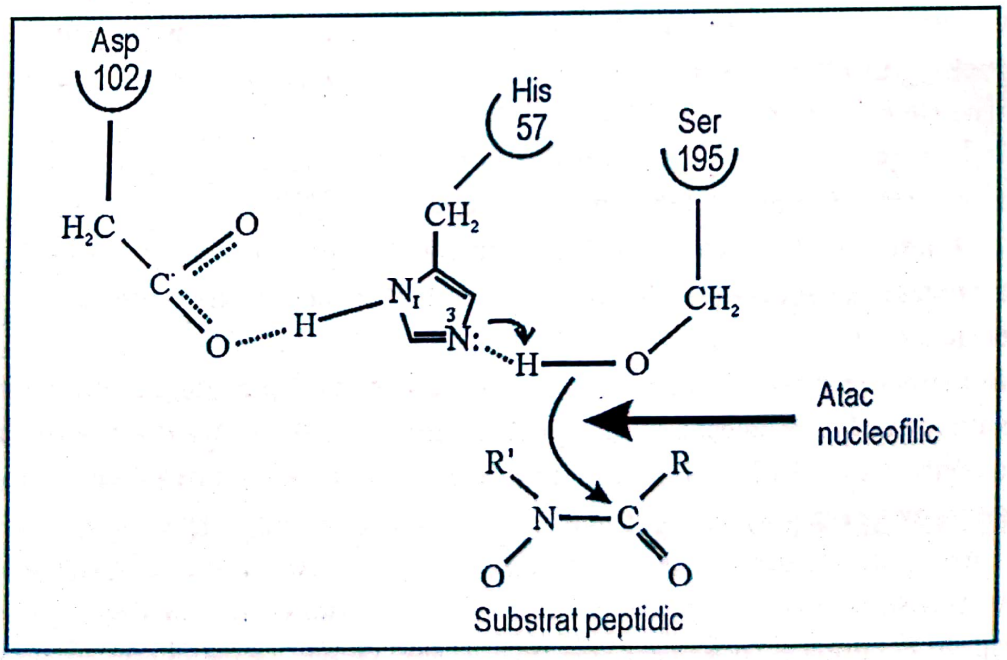


Fig. 208 – Triada catolitică în centrul activ al tripsinei

A urmat transferul acestui vector în segmente de frunze de tutun cu ajutorul lui *Agrobacterium tumefaciens* şi s-a selectat prin creşterea acestora pe celule cu kanami-

Scanned with OKEN Scanner

cină, ADN-ul clonat care a fost indus apoi plantelor de mazăre. Plantele de mazăre transgene astfel regenerate au demonstrat că larvele *H. visescens* nu au putut să supravieţuiască pe plantele modificate genetic care au conţinut mai mult de 2 μg/miligram proteină inhibitor al tripsinei mazării cu bobul lung.

Semințele de mazăre care conţin circa 2 μg inhibitor pro miligram proteină vegetală s-au dovedit netoxice atât pentru animale cât şi pentru oameni, aspect practic foarte important.

Dacă totuşi specialiştii constată că o anumită plantă transgenică produce o cantitate de inhibitor proteazic periculoasă, atunci se procedează la limitarea expresiei genetice a inhibitorilor proteazici, în special pentru culturile folosite ca alimente, furaje sau ca alimentaţie directă. Reamintim că un inhibitor proteazic inactivează ireversibil proteazele, atât la animale cât şi la oameni. Reamintim de asemenea că proteazele sunt principalele enzime ale digestiei.

Antipaina este inhibitorul care blochează tripsina despre care am vorbit mai sus. Producţia de antipainã şi eventual alţi inhibitori ai proteazelor precum Leopeptin, Pepstatin, Chymostatin pot fi blocaţi în frunzele şi rădăcinile unor plante prin inducerea unor coproteine care să remodereze expresia genei. Se obţin în felul acesta fructe şi seminţe de o valoare economică şi alimentară deosebită.

O a doua strategie destinată a mări activitatea relativ redusă a lui *Bacillus turigiensis* se referă la producerea în plantă pe lângă toxina *Bacillus turigiensis* şi a unui inhibitor al serinproteazei. Cercetările efectuate în laborator de către diverşi cercetători au arătat că prin această combinaţie rezistenţa plantelor la atacul insectelor creşte de peste 20 de ori comparativ cu cea indusă de protoxina *Bacillus turigiensis*.

Pentru realizarea tehnicii genetice necesare acestei strategii s-a „construit" un segment ADN care codifică o fuziune proteică între un inhibitor proteazic şi o toxină scurtă dar purificată genetic (e vorba, firește, de proteina care o codifică). Plantele transgenice de tutun obţinute pe această cale, deşi au sintetizat cantităţi mici din aceste proteine fuzionate, au fost protejate de atacul insectelor. Această strategie stă la baza OMG-ului din generaţia 2. ■

4.5. A DOUA GENERAŢIE DE ORGANISME MODIFICATE GENETIC PENTRU CONTROLUL INSECTELOR DĂUNĂTOARE

Contestate îndeosebi în Europa, dar adulate în America, unde OMG-urile din generaţia I au ocupat în jur de 50% din suprafeţele cultivate cu soia, porumb şi bumbac, au totuşi anumite deficienţe pe care le-am prezentat anterior la care se adaugă şi altele de ordin biotehnic dar şi politic.

1. Eficienţa protoxinei *Bacillus turigiensis* este limitată, atât ca eficacitate cât şi ca diversitate în combatere.
2. Există serioase probleme privind puritatea materialului genetic transferat, existând material genetic liber ale cărui efecte secundare nu sunt cunoscute.

Scanned with OKEN Scanner

3. Prezența permanentă a protoxinei *Bacillus turigiensis* în plante creează probleme privind siguranța entomofaunei utile și lasă semne de întrebare privind siguranța alimentară atât de discutată azi în plan european.
4. Disputa a depășit planul științific și economic, creând aprige dispute politice între SUA și Europa. De aceea, îmbunătățirea tehnicilor genetice și lărgirea preocupărilor cercetătorilor europeni în acest sens, pe de o parte ar elimina o foarte mare parte din riscurile ecologice și a celor legate de siguranța alimentară a Europei, iar pe de altă parte ar stinge conflictul americano-european. Revenim deci asupra acestui subiect cu cercetări făcute de data aceasta în Europa.

Așadar, după ce în America și chiar în multe țări din Europa, chiar și în UE, unde nu există o legislație permisivă OMG-urilor* a fost introdusă prima generație de OMG, constând în soiuri și hibrizi de plante, rezistenți în mod deosebit la anumite erbicide netolerante pentru culturi, în vederea reducerii sortimentului de toxine în ecosistemele agricole. Recent revista Science & Vie în numărul său 1017 din iunie 2002 anunță descoperirea primelor OMG-uri considerate ca fiind a doua generație.

În acest sens, se anunță că un laborator francez situat nu departe de Montpellier, într-o pădure de pin, a pus la punct un nou „sortiment de orez" căruia nu știm dacă putem să-i spunem soi sau subspecie, care are ca principală însușire protecția orezului împotriva unei larve miniere asemănătoare sfredelitorului porumbului și care este cunoscută sub denumirea științifică de *Chilo suppressalis*. Acest vierme minier poate distruge, în caz de neefectuare a tratamentelor, în Asia, până la 90% din recolta de orez care constituie hrana de bază a peste 3 miliarde de locuitori (fig. 209).

Fig. 209 – Larvă de *Chilo suppressalis*

* În momentul apariției cărții UE a acceptat parțial și condiționat de etichetare utilizarea OMG-urilor în produsele alimentare.

Scanned with OKEN Scanner

Adultul care dă naştere larvei din figură este un fluture mic de culoare gri-bej care îşi depune ouăle pe frunzele orezului. Larvele eclozate ocupă, invadează tulpinile plantelor de orez efectuând un fel de minitunele, forate, care se unesc, provocând căderea şi apoi moartea plantelor. Pagubele se situează, de regulă, între 60 şi 90%. Mai mult de jumătate din insecticidele utilizate în orezării în aceste zone sunt destinate combaterii acestor dăunători.

„Laboratorul din pădurea de pini" aparţine Centrului de Cooperare Internaţională pentru Cercetare Agronomică şi Dezvoltare, denumit pe scurt CIRAD. Or, această descoperire este considerată un nou „salt calitativ" al tehnicilor genetice. Noua generaţie genetică pleacă tot de la *Bacillul thurigiensis* (Bt), bacterie folosită multă vreme prin creştere pe medii de cultură ca preparat considerat ecologic împotriva numeroşilor dăunători ca şi în tehnicile genetice de obţinere a OMG-urilor de primă generaţie. ■

4.5.1. Avantajul noilor OMG (Bt)

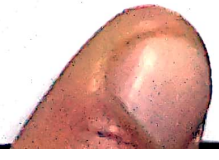
Avantajul noilor OMG constă în faptul că noua descoperire, noua reuşită CIRAD conduce la obţinerea transgenică a unei plante de orez care nu produce toxina decât în momentul în care se declanşează atacul larvelor şi numai în acea parte a plantei în care insecta începe să atace, să devoreze, să foreze.

Pentru a înţelege mai bine fenomenul trebuie ştiut că genele comandă, în general, formarea proteinelor vitale, fie că ele intră în structura şi consolidarea membranelor sau a sistemului osos, sau cele funcţionale care intră în componenţa enzimelor. De regulă însă o genă nu se activează decât atunci când o parte a ei (o secvenţă sau un lanţ proteic) ordonă, comandă celeilalte părţi cunoscută ca „secvenţă codantă" să fabrice proteina cerută.

Promotorul genei Bt joacă rolul de întrerupător sau, cum spun americanii, el apasă constant pe „On" pentru toate genele care operează, care fac managementul celulei. Pentru a fi siguri că toxinele insecticid sunt bine produse, primii geneticieni şi-au luat libertatea de a introduce gena Bt cu ajutorul unui promotor mai puternic şi mult mai stabil decât cel obişnuit, cel natural al genei Bt şi aici se face prima diferenţă. Acest promotor, sau protagonist cum i se mai spune, se numeşte **ubiquintină** şi este o proteină esenţială a metabolismului, prezentă în toate celulele.

Recent s-a constatat că măsura de siguranţă luată de geneticieni nu este necesară căci „a obţine o armă defensivă (o genă) în planta nou creată pentru exprimarea constantă a acestora în toate ţesuturile este absurdă" afirma Jean Christophe Breitler, un tânăr genetician de la CIRAD şi în continuare: „Este de fapt vorba de o mare risipă de energie pentru plante. Pe de altă parte, apariţia şi rămânerea în permanenţă a toxinei, acumularea ei în plante poate conduce destul de repede la apariţia fenomenului de rezistenţă la insectele ce trebuie combătute. În consecinţă, reacţia plantelor ar putea fi diferită faţă de aşteptările vizavi de ea.

Pentru a evita această situaţie, echipa de la CIRAD a introdus în cercetare un promotor mult mai adaptat. Acesta a fost găsit într-o genă a porumbului şi este denumit



Scanned with OKEN Scanner

„m.p.i.". El împiedică larvele sfredelitorului de a-şi digera hrana. S-ar putea spune că această „armă defensivă nu este suficient de eficace". În fond, el inhibă puţin enzimele digestive, adică protează. În schimb, este foarte sensibil. El se declanşează la cel mai mic semnal de atac al insectei şi numai în părţile lezate ale plantei (frunze, tulpini, etc.). Utilizând această idee, cercetătorii, folosind promotorul au legat secvenţa codantă de gena toxinei Bt obţinându-se acea fuziune proteică prezentată mai sus. Procedeul a reuşit pe deplin, toxina nu poate fi produsă nici de către polen şi nu este produsă şi nicidecum acumulată în plantele comestibile, respectiv în cariopse. ■

4.5.2. Markeri în afara circuitului

Aşadar, gena Bt este prezentă în toate celulele plantei transgenice şi ea ar putea, de această dată, să pună problema diseminării sale în natură prin polen sau seminţe, conform Legii lui Mendel, adică legea transmiterii caracterelor ereditare.

Mai trebuie luat în considerare şi faptul că, în cazul genei Bt, avem de-a face cu multe alte gene „străine" (în polen sau seminţe) care, prin diseminare, nu pot conduce decât la obţinerea unor plante transgenice. Aceste gene transportoare se numesc „markeri". Sunt cunoscute în acest sens două tipuri. Unul serveşte la selecţionarea bacteriilor care vehiculează gena (Bt), în mica buclă a ADN-ului extracromozomic (plasmidele). Acestea sunt gene rezistente la antibiotice. Cel de-al doilea serveşte la marcarea celulelor vegetale care moştenesc gena Bt deoarece frecvenţa reuşitei, a transferului, este slabă. Cercetătorii CIRAD au găsit ca genă marker - vegetal o genă rezistentă la o otravă universală, adică multifuncţională, nespecifică şi care a căpătat denumirea de Hygromicină.

Urmare a unei „băi" în această „otravă" vor supravieţui numai celulele vegetale transformate care sunt automat regenerate în plante transgenice (vasul 1, fig. 210).

Ajunşi în aceste condiţii, miza jocului în continuare constă în a face o departajare şi debarasare de plantele care nu conţin gena Bt. De regulă, acest lucru se face cu markeri bacterieni. Aşa s-a pocedat la OMG-urile genetice 1.

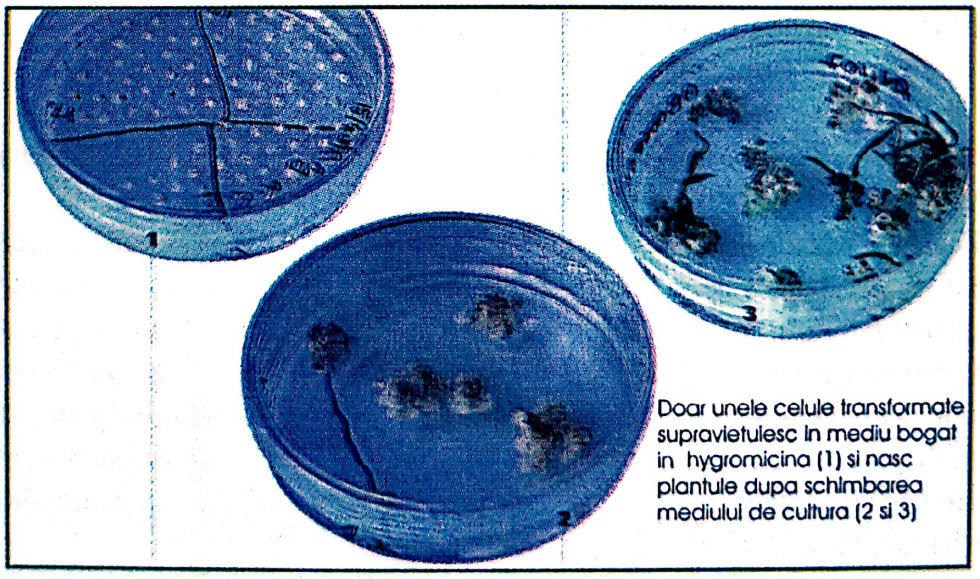


Fig. 210 – Obţinerea plantelor transgenice de orez prin selecţie pe hygromicină

Scanned with OKEN Scanner

Neliniştea publicului consumator faţă de aceste gene, şi în special faţă de modul lor de diseminare, a fost indusă (cu siguranţă incorect) şi politicienilor care, în consecinţă, au decis că aceşti markeri şi aceste gene nu mai trebuie să apară în plantele transgenice comercializate începând cu anul 2005. S-a căutat şi s-a găsit, ca urmare, o nouă soluţie tehnică în ideea de a părăsi canoanele, obişnuitul neacceptat. Aceasta constă în bombardarea plasmidelor celulei vegetale cu bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (vezi figura 211 şi apoi continuarea).

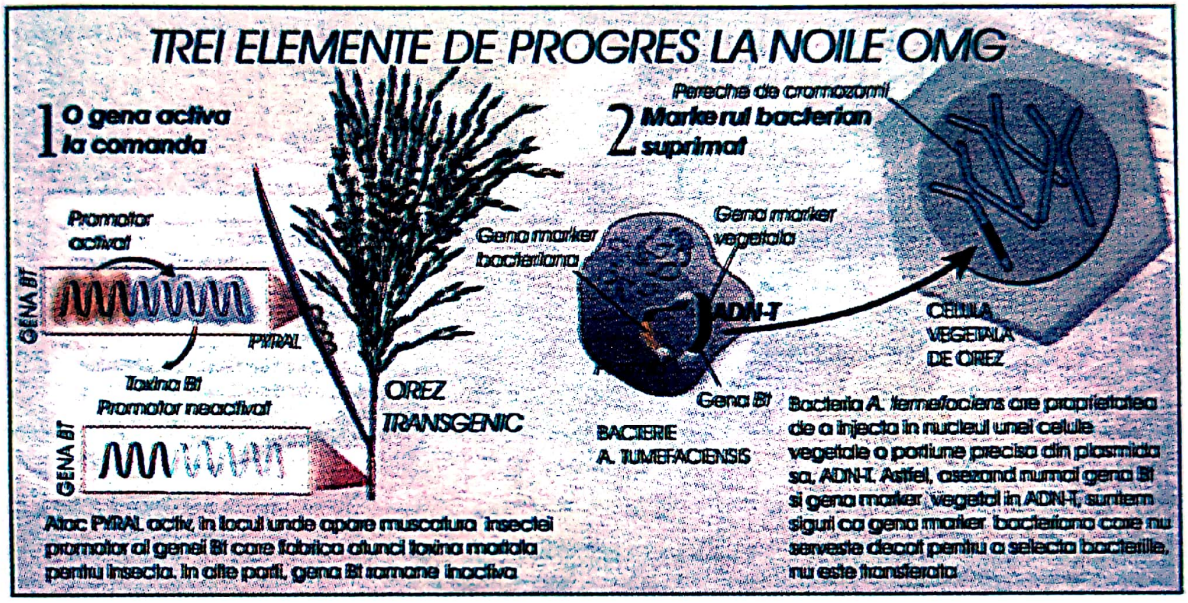


Fig. 211 – Trei elemente de progres la noile OMG.
1. Atac PYRAL, în locul unde apare muşcătura insectei promotor al genei Bt care fabrică atunci toxina mortală pentru insectă. În alte părţi, gena Bt rămâne inactivă.
2. Bacteria *Agrobacterium tumefaciens* are proprietatea de a injecta în nucleul unei celule vegetale o porţiune precisă din plasmida sa, ADN-ul T. Astfel, aşezând numai gena Bt şi gena marker vegetal în ADN-T suntem siguri că gena marker bacteriană care nu serveşte decât pentru a selecta bacteriile nu este transferată (*ilustraţie după Science et Vie*)

Acest nou mesager injectează în celula vegetală o parte exactă şi cunoscută a propriului său plasmid, adică un ADN transferat, căruia îi putem spune, aşa cum am văzut, ADN-t.

În laborator se plasează pe extremităţile acestui ADN genele care se transferă ele însele, adică genele de interes (Bt şi hygromicina) în timp ce genele marker bacteriene rămân în *Agrobacterium tumefaciens*.

Pasul următor constă în eliminarea genei marker vegetal - gena hygromicină. Pentru aceasta au fost proiectate două căi:

a) Se construieşte un plasmid de *Agrobacterium tumefaciens* care dispune, poartă cu el două ADN-T diferite, şi anume:
   - unul care poartă gena rezistenţei la hygromicină;
   - altul care poartă gena utilă (Bt).

Scanned with OKEN Scanner

Rezultatul constă în aceea că într-un anumit număr de cazuri cele două tipuri de ADN-T se plasează unul alături de altul pe zonele cromozomiale distincte ale ADN-ului celulei vegetale gazdă. Ele se ataşează însă suficient de îndepărtate unul de altul, pentru a se transmite de asemenea independent unul de altul în descendenţi. Adeseori ele se plasează chiar pe cromozomi diferiţi.

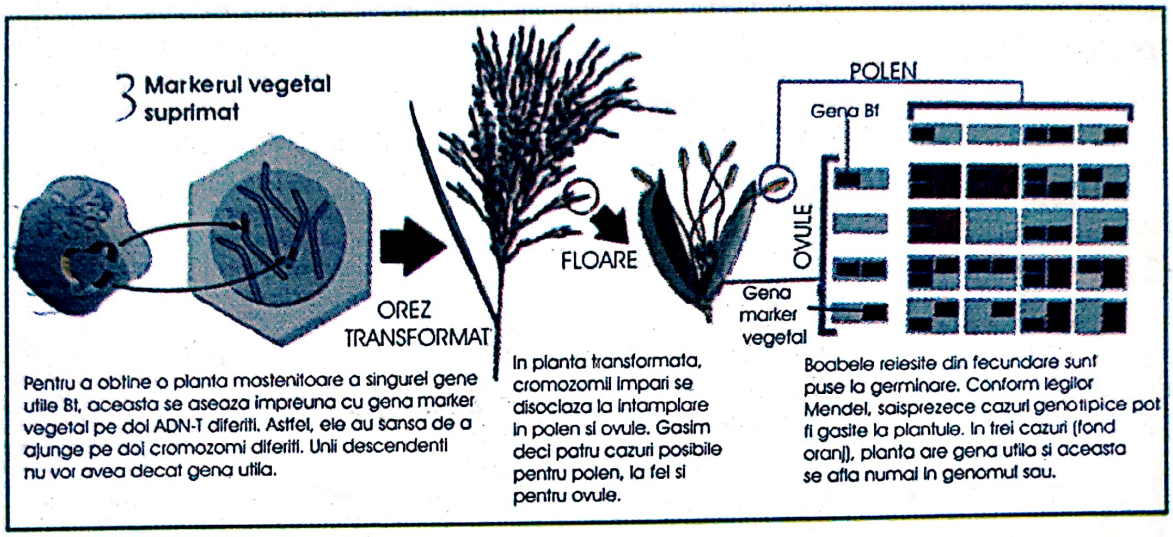


Fig. 211 – Continuare.
3. Pentru a obţine planta moştenitoare a unei singure gene utile Bt, aceasta se aşază împreună cu gena marker vegetal pe doi ADN-T diferiţi. Astfel, ele au şansa de a ajunge pe doi cromozomi diferiţi. Unii descendenţi nu vor avea decât gena utilă.
În planta transformată, cromozomii impari se disociază la întâmplare în polen şi ovule. Găsim deci patru cazuri pozitiv posibile pentru polen, la fel şi pentru ovule.
Boabele reieşite din fecundare sunt puse la germinare. Conform legilor lui Mendel, şaisprezece cazuri genotipice pot fi găsite la plantule. În trei cazuri (fond orange) planta are gena utilă şi aceasta se află numai în genomul său

Conform Legii lui Mendel, în 1/4 din descendenţi se va regăsi o plantă regenerată, adică aceea care poartă gena de interes (Bt). Cu aceasta nu totul este însă rezolvat. Mai există o problemă. Gena Bt este în continuare flancată la extremităţi de ADN-T care, aşa cum am văzut mai sus, este de natură bacteriană. Prin urmare, avem încă de-a face cu un amestec neconfortabil între regnul vegetal şi cel bacterian. Or, un asemenea sistem nu ar putea funcţiona şi a constituit şi slăbiciunea OMG-urilor de generaţia 1.

b) Pentru a rezolva şi această problemă trebuie, în consecinţă, scos ADN-T din sistem. Procedeul găsit este extrem de simplu şi de eficace şi are un singur nume „TRANSPOSON". Acesta este o genă foarte frecventă care fabrică o „proteină-foarfece" (enzimă de restricţie) care, funcţional, taie acel segment ADN pe care se recunosc cele două extremităţi specifice, îndepărtându-le mult unul de altul. Dacă extremităţile decupate de către transposon sunt cele ale genei utile, aceasta va fi deplasată şi transmisă prin ereditate în mod independent. În fine, procedeul se încheie prin separarea în descendenţă a indivizilor care poartă moştenirea genetică indusă de cea pe care o au ei înşişi (vasele 2 şi 3 din figura 210; figura 212).

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 212 – Selecția descendenților transgenici

Inovațiile efectuate de CIRAD și prezentate mai sus la orez deschid drumul producerii OMG-urilor de generația a doua. Acestea sunt considerate ca fiind mult mai eficace și mai „CURATE". Avantajele mari pe care le deschide cercetătorilor această tehnologie genetică deja patentată sunt determinate de cunoașterea în curând a altor procedee prin care genele de interes vor fi introduse într-o regiune predestinată a genomului plantelor. Există încă multe incertitudini asupra locului unde trebuie introdusă gena de interes în genomul plantei gazdă. Or, pentru acest lucru se caută argumente foarte solide care pot să conducă la consolidarea OMG-urilor ale generației a doua și trecerea lor la cele de generația a treia. ■

4.6. INDUCEREA REZISTENȚEI GENETICE LA VIRUSURILE PLANTELOR

Bolile virale la plante, ca și la oameni, sunt extrem de periculoase pentru că ele nu reacționează la tratamente chimice obișnuite de protecție a plantelor. Daunele aduse de virusuri plantelor sunt foarte mari din punct de vedere economic, atât în plan cantitativ cât și calitativ. De aceea, introducerea în plantele de cultură a unor gene care să inducă rezistența împotriva virusurilor, am putea spune că este într-o măsură mai mare dorită decât în alte cazuri (insecte, buruieni, boli etc.).

Pe de altă parte, virusurile sunt extrem de numeroase iar inducerea unei gene rezistente la un anumit virus nu înseamnă că ea va proteja cultura și împotriva altor virusuri.

Plantele pot să fie rezistente contra virusurilor prin mai multe metode:

- pot împiedica pătrunderea sau înmulțirea lor;
- pot accepta o infecție virotică pe care să o controleze.

În ultimul timp tehnologiile genetice au dezvoltat plante transgenice neobișnuit de rezistente la virusuri. Ca metodă principală s-au utilizat un fel de „vaccinări" ale plantelor cu gene virale deosebite învelite în membrana unui alt virus, după ce materialul

Scanned with OKEN Scanner

genetic al acestuia a fost extirpat. Locul genelor vaccin poate fi luat de aşa-numitele secvenţe antisens virale ale genelor. Mecanismul prin care proteinele membranelor virale împiedică proliferarea virusurilor nu este pe deplin cunoscută. Este totuşi cunoscut faptul că aceasta (adică membrana) deja în fază timpurie acţionează asupra ciclului de replicare şi prin aceasta se blochează sintezele viitoare ale virusului.

Această însuşire a membranelor „împrumutate" este de mare importanţă deoarece reduce probabilitatea selecţiei unor mutante virale care ar putea să spulbere această rezistenţă, putând declanşa procesul de replicare al proteinelor virale. ■

4.6.1. Metoda genei membranei proteice a virusului

Este suficientă însă pentru a proteja numeroase plante de atacul virusurilor iar pentru acestea menţionăm: trei virusuri la tutun, virusul mozaicului la castraveţi, virusul mozaicului la lucernă, virusurile x şi y la cartof.

Pornind de la aceste cunoştinţe cercetătorii au transferat o genă a proteinei membranei virale la plantele testate, adică: tutun, lucernă, tomate şi cartof. Deşi rezistenţa nu acoperă 100% protecţia culturilor, rezistenţa este considerată bună.

Gena proteinei membranei a unui virus împrumută de regulă o forţă de rezistenţă a plantelor împotriva unui spectru larg de virusuri care nu sunt neapărat înrudite. Experienţele de câmp au confirmat rezultatele obţinute în laborator şi deci metoda este considerată ca foarte utilă. ■

4.6.2. Metoda antisense-secvenţe virale gene

Prin antisense-ARN se înţelege o moleculă de ARN care în condiţii normale ale transcripţiei genei (în cazul virusurilor m-ARN) este complementară. Ea se întâlneşte atât la pro cât şi la eucariote. m-ARN-ul translatabil (adică acela care se transferă) este denumit sense-ARN. Antisense-ARN este deci produsul genetic cu acţiune împotriva lui sense-ARN şi este destinat a reduce sinteza unui produs genetic în sensul că sense-ARN normal care formează o dublă bandă nu mai poate fi translatat, deci dubla bandă nu se mai formează. Perechea ARN va fi repede degradată şi prin aceasta se reduce cantitatea acestui ARN din celule. Prin dezvoltarea plantelor transgenice care sintetizează o proteină virală m-ARN complementară, adică antisense-ARN este principial posibilă replicarea plantelor rezistente la virus şi, ca urmare, eliminarea daunelor cauzate ţesuturilor.

În continuare se prezintă un experiment care compară cele două metode mai sus prezentate:

- metoda genei proteinei membranei virale;
- metoda antisense ARN.

Pentru aceasta s-au derulat următoarele etape de lucru:

a) S-a clonat proteina membranei c-ADN a mozaicului virusului la castraveţi (CuMV) pe două direcţii diferite de orientare a genelor (sense şi antisense). S-a realizat câte o orientare pe plantă. După implementarea genelor în plante s-a cercetat măsura sensibilităţii plantelor transgene la agresiunile virale. Rezultatele acestei experienţe sunt prezentate în figurile 213 şi 214. CuMV (repet, al virusului castraveţilor, iniţiala Cu venind de la curcubitacee) se aşază pe trei benzi separate de molecule de ARN laolaltă. Fiecare dintre ele va codifica o proteină specifică. Prin procesarea *in vivo* o parte a ARN-ului, şi anume secvenţa ARN-3 va fi îndepărtată. Rămâne numai ARN-4 care codifică proteina virală a membranei.

Scanned with OKEN Scanner

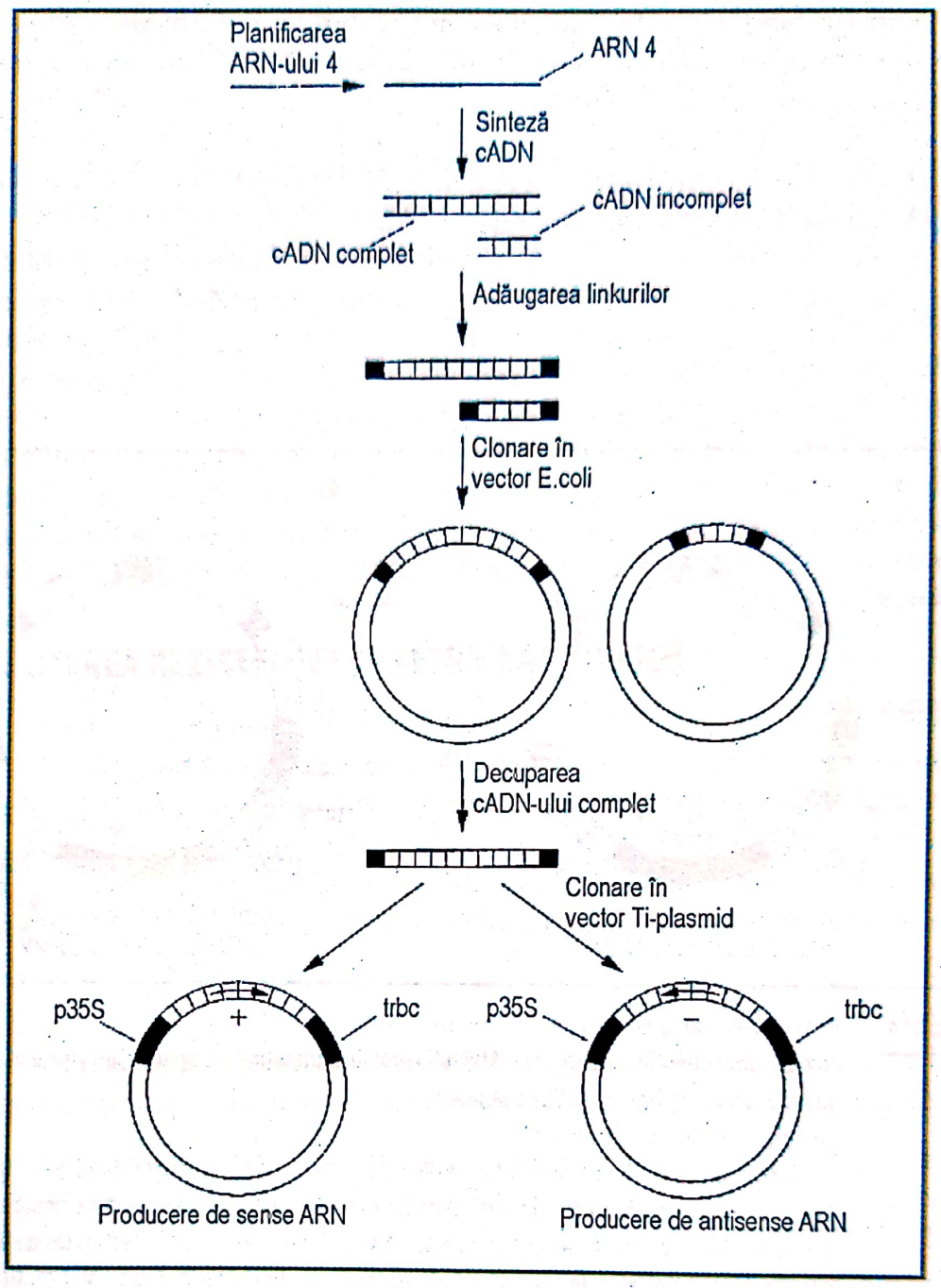


Fig. 213 – Procedeul inducerii rezistenței la virusuri prin utilizarea cADN-proteine membranice virale. Dintr-un preparat ARN viral se izolează ARN-4 care codifică proteina membranoasă pe care apoi o folosește ca matriță pentru sinteza unui c-ADN dublu bandă. În final se adaugă linkeri preparatului c-ADN iar c-ADN se clonează într-un vector plasmid pentru *Escherichia coli*. Se identifică o clonă c-ADN completă, se secționează și se scoate din vectorul *E. coli* și se subclonează într-un vector de clonare Ti-plasmid pe o locație între promotorul 35-S și terminația transcripțională a genei pentru mici subunități ale ribulosebin-fosfat-carboxilase (trbe). Prin această nouă clonare rezultă două feluri de plasmide care se deosebesc în funcție de orientarea ARN-4 - c-ADN. În grupa din stânga prin plasmide ARN-ul transcriptibil este translatat în proteina membranoasă (sense-ARN) în grupa din dreapta ARN transcriptibil este complementar m-ARN-ului proteinei membranoase (antisense-ARN) (*după Bernard R. Glick și colab, 1995*)

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a fabrica plante transgene care să producă fie mARN normal care să exprime proteina virală membranoasă sau sinteza ARN-ului antisense corespunzător este necesară derularea următoarelor etape:

a1. Izolarea ARN-ului-4

a2. Transferarea enzimatică - *in vitro* a ARN-ului 4 într-un c-ADN dublu bandă.

a3. Cuplarea unor legături, unor derivaţii la c-ADN.

a4. Introducerea unei secvenţe complete c-ADN într-un vector de clonare în amândouă orientările, astfel încât secvenţa în amândouă direcţiile de citire să fie sub controlul promotorului P35-S obţinut din virusul mozaic al florilor de tutun şi al secvenţelor terminale regulatorii ale genei plantei pentru mica subunitate a carboxilazei-ribulosebin-fosfatică.

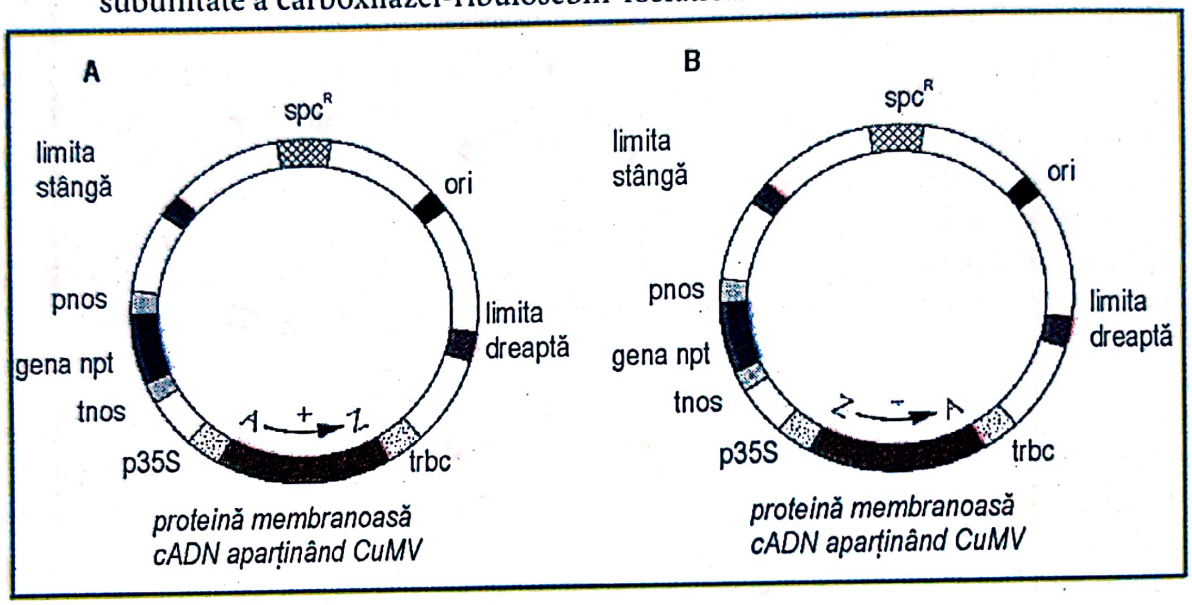


Fig. 214 – Ti-vectori de clonare binari.
În baza unor orientări diferite ale c-ADN-ului proteinei membranice aparţinând virusului mozaic al castraveţilor (CuMU) rezultă două variante:
A) ARN-ul producător de proteine
B) Antisense-ARN. Fiecare secvenţă c-ADN este reglementată de promotorul S-35 (p 35S) al virusului mozaicului frunzelor de varză şi de locaţia poliadelirică a micii unităţi a ribulosebifosfatc aboxilase (trbc). Vectorul care conţine de asemenea o genă, neomicin-fosfotransferază (npt) sub coordonarea semnalelor de transcripţie ale sintezei napolinei (p.nos, t.nos). Mai conţine o genă rezistentă la spectinomicină (spc^R). Secvenţe T-ADN la limitele din dreapta şi stânga, ca şi un punct starter de replicare a ADN-ului (ori) pentru un mare spectru de virusuri. Orientarea în proteina formată este pozitivă (+) indicată de săgeata A → iar formaţia în care ARN-ul este aşezat invers este negativă (-) de la Z → A.

a5. Creşterea unei a doua grupe de plante transgenice şi care conţin fiecare c-ADN-ul în una din cele două posibilităţi de orientare. S-a ales sistemul vectorilor binari cu Ti-plasmid pentru a fi introduse secvenţele c-ADN în diferitele celule ale tutunului în vederea producerii proteinelor sense-ARN şi anti-sense-ARN. Din amândouă se regenerează plante transgenice (fig. 214). Acelea care exprimă proteina membranoasă au fost protejate de particulele virale şi nu indică nici o simptomă a

Scanned with OKEN Scanner

vreunei infecții virale, indiferent de faptul dacă a fost infectat un virus mai mult sau mai puțin agresiv. Plantele transgene care au exprimat antisense-ARN a proteinelor membranoase au fost protejate numai în cazul infecțiilor cu virusuri de agresiune slabă. Și alți cercetători au făcut asemenea experimente demonstrând o dată în plus că plantele transgene obținute prin inducerea copiilor ARN-antisense au fost mult mai puțin protejate decât cele obținute pentru exprimarea m-ARN-ului normal al genei proteice a membranei virale.

În consecință, deși metoda antisense-ARN creează o anumită rezistență a plantelor la virusuri, procedeul trebuie mult îmbunătățit pentru a se ajunge la performanțele dorite. În câteva publicații s-au putut obține informații din care reiese că rezistența la virusuri a plantelor transgenice s-ar putea obține și cu alte gene virale altele decât cele care exprimă proteinele membranoase. S-au dat exemplu aici sateliții virali ai ARN-ului sau o genă necesară replicării virusului. Până în prezent nu s-au putut demonstra nici în laborator și nici în câmp performanțele acestor noi propuneri de metode. ■

4.7. INDUCEREA REZISTENȚEI GENETICE LA ERBICIDE

Aplicarea erbicidelor pentru controlul buruienilor din culturile agricole solicită anual peste 100 de produse cu valoare de peste 10 miliarde USD. Cu toate acestea, pe însăși suprafețele tratate cel puțin 10% din nivelul recoltelor este pierdut în favoarea buruienilor, concurenți puternici ai plantelor. Costurile mari vorbesc de asemenea de la sine asupra găsirii unei metode și a unui sistem care să reducă semnificativ costurile și poluarea de oriunde ar veni ea și să realizeze un echilibru ecologic necesar, prin conservarea biodiversității.

1) Primul lucru ce trebuie efectuat înainte de a iniția procesul de transformare genetică este acela de a dispune de un erbicid cu acțiune suficient de mare încât să acopere spectrul întreg de buruieni care concurează cultura ce urmează a fi cultivată.

2) Al doilea lucru necesar este acum de a crea o plantă rezistentă la erbicidul respectiv și de a avea grijă ca buruienile să nu devină la rândul lor rezistente la același erbicid. Pentru a realiza o rezistență a plantei la erbicide ne putem gândi la următoarele soluții:

a) Se întrerupe, se suprimă preluarea erbicidului de către planta de cultură.
b) Se produc cantități mari de proteine care vor fi atacate de erbicid de o manieră că în prezența acestuia rămân încă suficiente proteine care să asigure activitatea normală a celulelor. Erbicidul este blocat prin legătura lui de o asemenea proteină.
c) Se evită ca o proteină sau mai multe proteine sensibile la erbicid să se cupleze la acesta.
d) Se pune planta în situația ca erbicidul să fie inactivat metabolic de către aceasta.

Până în prezent în practică au fost aplicate numai ultimile trei soluții transformate în metodologii.

Scanned with OKEN Scanner

Au fost dezvoltate până în prezent plante rezistente împotriva erbicidelor glyphosat şi gluphosinat -amoniu, aceasta poate şi datorită faptului că acestea sunt considerate „prietenoase mediului" prin calitatea lor de a se descompune repede în sol în legături netoxice. Metoda utilizată este una mixtă, producerea de proteine şi degradarea metabolică, enzimatică a erbicidelor.

Precizăm aici că erbicidele care se inactivează prin legarea de proteine solicită molecule specifice cu o masă moleculară de 32.000 obţinute prin fotosistemul II într-un raport 1:1 în care caz blochează transportul electronilor. Dacă raportul este de 2:1 în favoarea proteinelor, acţiunea toxică a erbicidului nu se mai manifestă.

După alţi autori, procesul de formare a rezistenţei plantelor la erbicide s-ar obţine prin:

- supraexprimarea unei enzime care blochează erbicidul şi care măreşte toleranţa plantei;
- substituirea anumitor aminoacizi în secvenţa enzimatică responsabilă de blocare fie pentru mărirea forţei de blocare, fie prin reducerea ei, după caz şi interes;
- distrugerea toxinei erbicid prin utilizarea unor enzime împrumutate de la gazde străine (vectori) şi care prin transformarea genetică a plantelor pot fi produse în acestea.

În mod practic una din genele de interes care exprimă un caracter dorit este introdusă în celula plantei care apoi regenerează planta conform figurii 215.

Care sunt însă genele de interes în acest caz? Să luăm, de exemplu, o plantă care dorim să devină rezistentă la glifosat. Pentru a fi activ, glifosatul inhibă enzima EPSPS, adică 5-enolpiruvilshikimat-3 fosfatintese. Aceasta este o enzimă care favorizează schimbul acizilor shikimici. Enzima se găseşte atât în bacterii cât şi în plante, unde joacă un rol deosebit în sinteza aminoacizilor aromatici.

Şi acum tehnica:

a) Se izolează o genă care codifică **EPSPS** dintr-o suşă de *Escherichia coli* rezistentă la glifosat.
b) Aceasta se supune controlului transcripţional al unui promotor obţinut din secvenţele genetice ale speciei *Arabidopsis thaliana* ca şi secvenţei poliadenilirice terminale se clonează şi cu ajutorul vectorilor prezenţi în figura 215 se creează planta transgenică.
c) Plantele transgene astfel obţinute fie că sunt porumbul, soia, tutunul, petuniile, tomatele, cartoful sau tutunul, produc acum suficient **EPSPS** de natură *Escherichia coli* pentru înlocuirea sistemului de inhibare al plantelor şi devin deci rezistente la glifosat în timp ce buruienile rămân sensibile.

3) Alte gene de interes pot fi legate de inhibarea altor erbicide şi ele sunt depistate în funcţie de modul de acţiune al acestuia. Să luăm cazul bromoxinilului (3,5 - dibromo - 4 hydroxybenznitril), un erbicid care acţionează prin inhibarea fotosintezei. Pentru blocarea acţiunii erbicidului este necesar ca acesta, în prezenţa enzimei nitrilază să fie neutralizat conform reacţiei din figura 216.

Scanned with OKEN Scanner

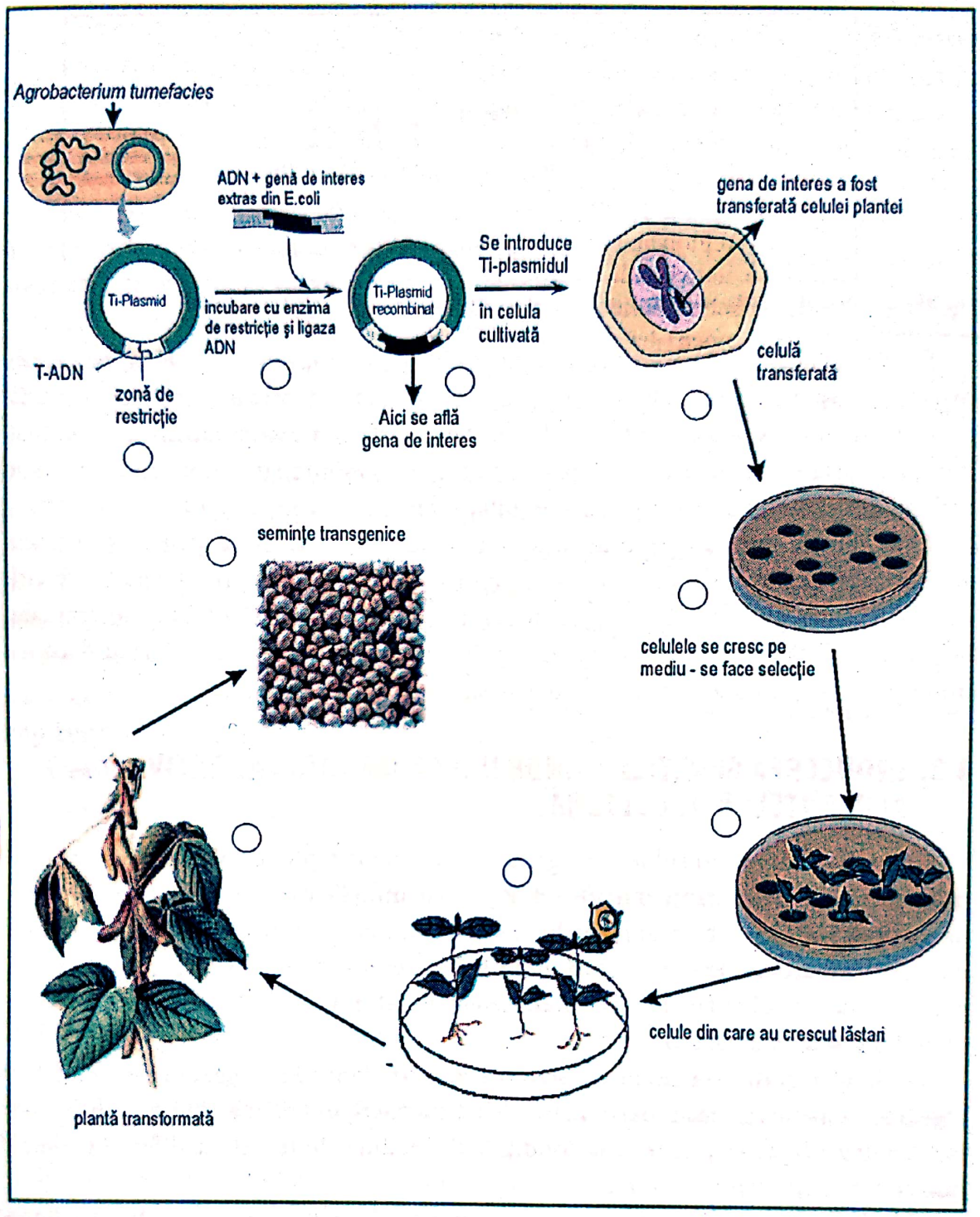


Fig. 215 – Schema inducerii genei de interes în procesul creării rezistenței la erbicide (*original*).
1) Se folosește ca gazdă *Agrobacterium tumefaciens* de la care se recoltează Ti-plasmidul.
2) Prin recombinarea acestuia i se adaugă gena de interes, obținându-se un Ti-plasmid recombinat.
3) Ti-plasmidul recombinat este introdus în celula plantei aflată pe mediul de cultură.
4) Gena de interes este captată în genomul celulei care devine celulă transformată.
5) Celula transformată crește pe medii de cultură, formează mici lăstari (6), lăstari mai mari (7) care, transferați în câmp, obțin planta transformată (8). Aceasta va obține semințe (9) care vor da naștere de asemenea la plante transformate

Scanned with OKEN Scanner

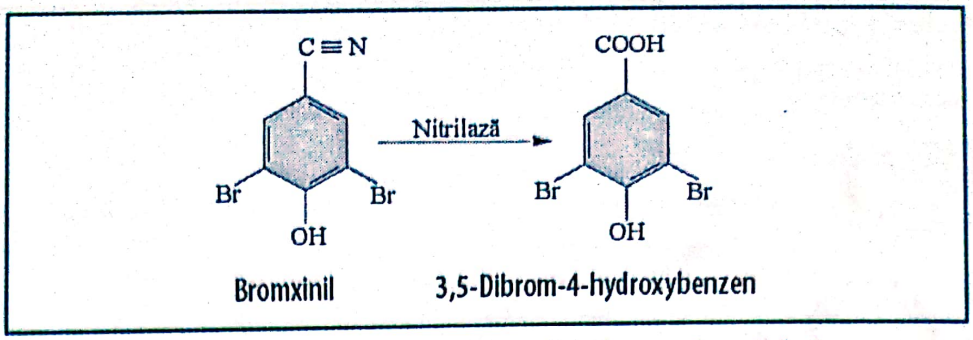


Fig. 216 – Degradarea în metaboliți netoxici a bromoxinilului utilizându-se enzima nitrilază.

Rezistența plantelor în acest caz se va putea obține prin introducerea unei gene pe aceeași cale ca cea prezentată în figura 215, genă care să exprime formarea enzimei nitrilază.

Gena de interes poate fi obținută din bacteria *Klebsiella ozanae* izolată din sol. Înainte ca aceasta să fie transferată în plante ea trebuie subordonată unor promotori care reglementează lumina ca și micuței subunități a enzimei carboxilază ribulasebifosfat.

Experiențele efectuate pe tutun au arătat că plantele transgene exprimând nitrilaza au fabricat o cantitate suficient de mare pentru a deveni complet rezistente la erbicid. În mod similar pot fi depistate gene și pentru inducerea rezistenței la alte erbicide, bineînțeles dacă acest lucru are valoare științifică și practic - comercială și dacă nu implică efecte secundare care să inducă nesiguranță alimentară. ■

4.8. INDUCEREA GENETICĂ A UNOR NOI PARAMETRI CALITATIVI AI PLANTELOR DE CULTURĂ

Când discutăm acest subiect, ne gândim neapărat la faptul că plantele sunt principalii furnizori de substanțe nutritive, atât pentru animale cât și pentru oameni. Obținerea unor soiuri și hibrizi ai plantelor care să conțină mai multă proteină, mai multe uleiuri și zaharuri după caz, reprezintă un deziderat care se obține foarte anevoios prin genetica clasică, iar uneori durata selecției naturale a unei mutante utile poate dura chiar și o viață de om.

Pe de altă parte, s-a putut constata că actuala construcție genetică a plantelor, construcție naturală, face foarte mare risipă de energie, energie utilizată cu deosebire pentru adaptarea plantelor la condițiile de mediu și îndeosebi la diferite stresuri, despre care vom vorbi mai târziu.

Tehnicile genetice cunoscute acum permit cercetătorilor să acceseze căutarea unor gene care să poată fi implementate plantelor, care răspund la numeroase probleme privind cantitatea și calitatea produselor. Până în prezent la nivel de laborator au fost rezolvate următoarele probleme:

a) Ridicarea valorii nutritive a diferitelor specii de plante prin schimbarea compoziției, conținutului în aminoacizi, în proteine și ridicarea nivelului acestora în plante.

b) Creșterea conținutului în acizi grași și schimbarea structurilor în grăsimile diferitelor plante oleaginoase în vederea îmbunătățirii rațiilor furajere și a hranei

Scanned with OKEN Scanner

umane. Sunt cunoscute în acest sens rezultatele obţinute de unele laboratoare americane, care au crescut cu 2-3% conţinutul de acizi graşi la porumbul local, utilizând gene extrase din unele populaţii de porumb, naturale din Mexic.

c) Calitatea fructelor şi a legumelor a putut fi îmbunătăţită prin introducerea genei unei proteine Monellin, dulce şi foarte aromată.

Monellin este o proteină solubilă formată din două polipeptide legate covalent şi care are o forţă de îndulcire de 2000-2500 ori mai mare decât zaharoza. În mod natural se întâlneşte în fructele roşii ale speciei *Dioscoreophyllum cumminsi* (menispermaceae), care vegetează în Zimbabwe şi Sudan. Cele două lanţuri polipeptidice sunt alcătuite din 44, respectiv 54 resturi de aminoacizi. Este de fapt prima proteină dulce şi gustoasă pentru om. O a doua, descoperită mai târziu, este **Thaumatina**. Thaumatina este de 2000 ori mai dulce decât zaharoza şi a fost izolată din fructele speciei *Thaumatococcus damielli*. Este larg folosită pentru îndulcirea gumei de mestecat, a diferitelor deserturi, la supe în Asia şi îndeosebi în Japonia.

Genele extrase din aceste plante, acelea care induc polipeptidele respective prin metodologiile obişnuite pot fi induse la numeroase specii din zonele temperate, îmbunătăţindu-le substanţial gustul şi, în general, calităţile culinare.

De fapt, în cazul Monellinei a fost necesară sintetizarea unei gene alcătuite din secvenţe care să exprime atât primul lanţ polipeptidic „A" cât şi pe al doilea „B" care, împreună alcătuiesc miraculosul polipeptid atât de dulce şi gustos.

Această construcţie „fuzionată" a fost transferată tomatelor şi salatei care au devenit transgenice exprimându-se evident. Pentru expresia genei au fost utilizaţi doi promotori diferiţi, şi anume:

- la tomate s-a utilizat promotorul specific E8 care a fost activat la începutul maturităţii;
- la salată s-a folosit promotorul 35S (p.35S) de acum foarte cunoscut.

Ambele construcţii ADN utilizează pentru transcripţia terminală locaţia poliadenilirică a genei de sinteză a napolinei provenită dintr-un Ti-plasmid. Remarcăm că gena în cauză s-a exprimat mai bine în salată decât în tomate, în acestea din urmă cantitatea de Monellin putând fi crescută şi prin aplicarea biostimulatorului etilenă, specific plantelor.

Numeroase seminţe aparţinând unor specii care acumulează proteine conţin uneori aminoacizi esenţiali în cantităţi mici sau nu conţin deloc. Aceşti aminoacizi sunt foarte importanţi pentru fiziologia nutriţiei iar lipsa lor anulează calitatea proteinelor pentru hrana omului şi a animalelor. Este cazul lisinei şi a metioninei. Deşi genetica clasică poate aduce uşoare îmbunătăţiri acestor aminoacizi, tehnologiile genetice fac însă cea mai bună treabă.

Pentru corectarea acestei deficienţe s-au extras gene phaseolus din bob care au fost transferate în tutun. Gena a exprimat un complex de proteine în seminţe care a cuprins întreg spectrul de aminoacizi induşi. Transgena a exprimat corect iar produsul proteic a fost transportat la locul său de origine. Mai mult chiar, *in vitro* s-a ajuns

Scanned with OKEN Scanner

la modificarea secvenţelor nucleotide a genelor încât proteinele obţinute au indicat o mult mai bună structură a aminoacizilor.

Proteinele modificate au fost în plus altfel „împachetate" în seminţe de aleuronă prin comparaţie cu cele nemodificate. Am putea spune că s-a realizat o nouă ordine, mult mai economică atât în structura proteinică cât şi în forma lor de prezentare.

Cercetările recente arată că întreaga structură a proteinelor din seminţele protaginoaselor rămâne neschimbată la plantele transgenice dacă aminoacizii doriţi sunt codaţi pe o zonă hipervariabilă a terminalului c - finiş al moleculei.

În final, precizăm că deşi lipsesc rezultatele concrete privind inducerea gustului specific al unor alimente, cercetările care se află în derulare arată că rezultatele nu pot fi decât pozitive şi că în curând vom deţine fructe şi legume dulci şi gustoase fără adaos de zahăr sau adaosuri de ingrediente alimentare. ■

4.9. DIVERSIFICAREA COLORITULUI FLORILOR PRIN TEHNOLOGII GENETICE

Există astăzi o adevărată industrie a florilor care produce cifre de afaceri de miliarde de dolari pe an şi care încearcă în permanenţă să mărească această cifră prin îmbunătăţirea calităţii florilor. Or, acest lucru presupune:

1. O prezenţă şi ţinută mai frumoasă a florilor şi o durabilitate mai mare după recoltare;
2. Un colorit cât mai frumos şi atractiv, eventual colorituri neobişnuite pentru specia respectivă.

Pentru situaţia (2) există deja rezultate practice care conduc la obţinerea unui colorit neobişnuit dacă se modifică gena enzimei biosintezei flavonoidelor.

Flavonoidele constituie cele mai frecvente substanţe care colorează florile. Ele se sintetizează printr-o serie de reacţii enzimatice, pornind de la tenilalalin. Coloritul florilor reiese din acea parte a lanţului care conţine diferite structuri de bază. Din aceştia rezultă derivaţii cianidinici care oferă o culoare roşie şi derivaţi delphinidenici care oferă excelente tonalităţi albastre (fig. 217).

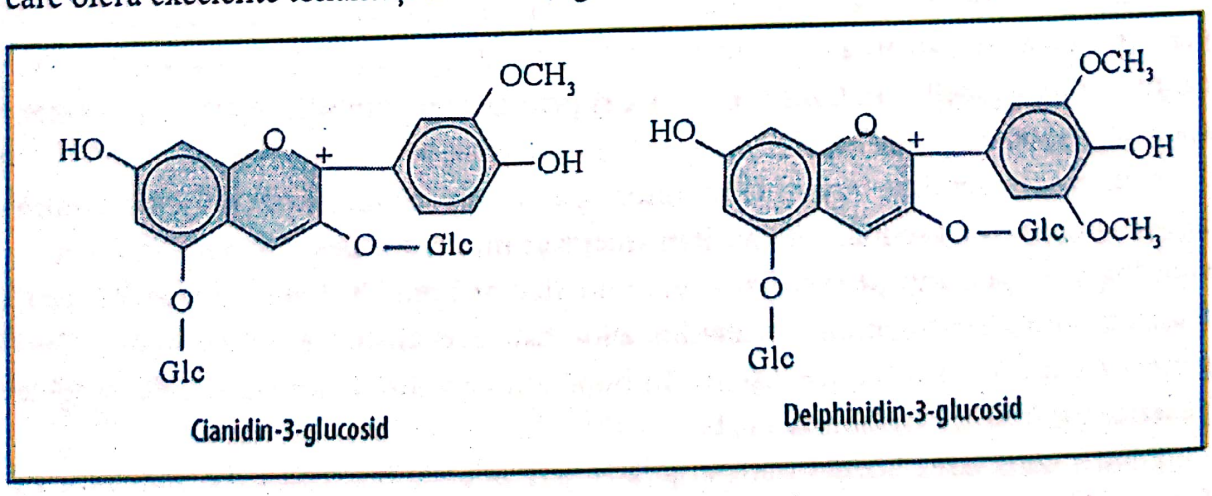


Fig. 217 – Formula chimică a unor pigmenţi florali.
1 = Cianidin 3 - glucozid - induce culoarea roşie
2 = Delfinidin - 3 glucozid - induce culoarea abastră

Scanned with OKEN Scanner

O serie de experimente au transformat petuniile utilizând ARN-ul antisense prin care s-au indus mai multe versiuni ale genelor implicate în schimbul de substanţe flavonoidice. Rezultatul a condus la obţinerea unei serii întregi de flori cu colorituri unice, excelente.

În acest moment nu se poate spune cum se poate modifica culoarea florilor deoarece nu se ştie exact în ce măsură, care anume gene se exprimă mai mult sau mai puţin.

Cercetările sunt însă avansate şi vizează cunoaşterea completă a regularizării diferitelor enzime implicate în schimburile de substanţe flavonoide. După aceea va fi posibilă obţinerea culorii dorite a florilor şi chiar mostre de culori unice. ■

4.10. INDUCEREA REZISTENŢEI PLANTELOR LA STRES ŞI ÎNTÂRZIEREA ÎMBĂTRÂNIRII LOR

Atât în cazul animalelor, cât mai ales al plantelor, posibilitatea supravieţuirii dar mai ales a realizării de producţii este negativ influenţată de anumiţi factori de mediu, îndeosebi de natură fizică, cum ar fi lumină agresivă, raze ultraviolete, căldură sau mai ales secetă (uscăciune în sol şi în aer). Stresul creează efecte de natură fiziologică care la nivelul moleculelor conduc la formarea radicalilor liberi de oxigen, radicali dăunători organismului. Dar nu numai oxigenul în condiţii de stres creează radicali liberi ci şi o seamă de produse de acumulare, de regulă toxice create de poluare, gaze de eşapament şi mulţi alţii. Acest fenomen, am putea spune ciudat şi neplăcut, este prezentat în figura 218 (Science et vie, 1028, mai 2003, p. 124).

Unul din radicalii care interesează plantele frecvent şi dăunător este radicalul denumit superoxidanion sau superoxid O_2^-. Din fericire, există o proteină, de fapt o enzimă, denumită superoxiddimutază (SOD) care inactivează superoxidul făcându-l biologic nedăunător, conform reacţiei. SOD-ul mai este cunoscut şi sub denumirea de **„superoxid** sau **superoxid-oxidoreductază.**

$$SODCu^{2-2+} + O_2 \rightarrow SOD\text{-}Cu^{1+} + O_2 \rightarrow$$
$$\rightarrow SODCu^{1+} + O^{2-} + 2H^+ \text{-}SOD\text{-}Cu^{2+} + H_2O_2 \text{ (peroxid)}$$

sau prescurtat:

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Peroxidul este degradat de peroxidază şi catalază în apă:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Ca efect se poate deci afirma că, pentru evitarea radicalilor liberi uneori foarte periculoşi pornind de la oxigen - superoxid, ar fi necesar ca planta în cauză să producă cât mai mult superoxiddimutază. În experimentele efectuate cu plante de tutun transformate, adică având implementată gena superoxid-dimutazei, fireşte sub controlul promotorului 35S, plantele au exprimat într-o măsură foarte mare enzima SOD încât ele au fost foarte bine apărate împotriva radicalilor pornind de la oxigen şi au fost evitate daunele provocate de aceştia (arsuri, pete etc.).

S-a constatat în plus că o concentraţie mai ridicată de SOD în plantele de cultură imprimă acestora o rezistenţă mai mare împotriva erbicidului cu acţiune totală metilviologen, cunoscut sub denumirea comercială de paraquat ca şi o mare toleraţă împotriva stresului cauzat de o intensitate luminoasă prea ridicată.

Scanned with OKEN Scanner

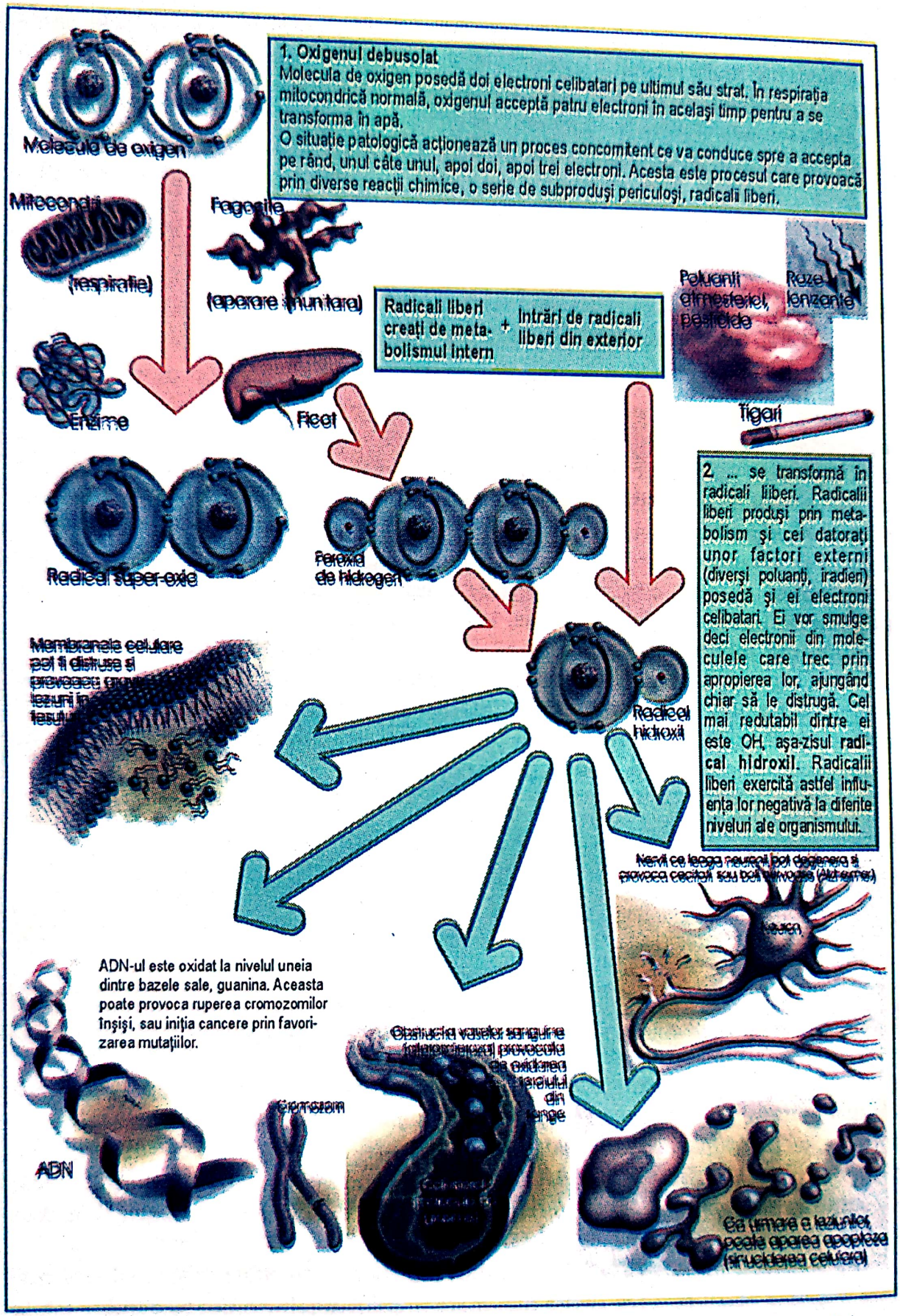


Fig. 218 – Formarea radicalilor liberi în condiții de stres creează pericole reale pentru viață chiar prin intermediul oxigenului

Scanned with OKEN Scanner

Indispensabil respirației celulare, oxigenul se află la baza vieții. Dar, printr-un fenomen curios, o parte din acest gaz vital se transformă efectiv în compuși chimici periculoși pentru organism: radicalii liberi, implicați în apariția cancerelor.

Fără oxigen nu am putea supraviețui. Cu toate acestea, acest gaz vital ar putea să se dovedească periculos pentru țesuturile biologice, Într-adevăr, în timp ce fiecare celulă își trage energia din oxigenul pe care-l respirăm, o parte din acest gaz prețios și anume 1-5% este transformat în compuși chimici, deosebit de toxici, radicali liberi, nume dat moleculelor al căror atom a câștigat sau a pierdut un electron.

GENA SOD indusă florilor își aduce o contribuție esențială la menținerea proaspătă a acestora pe timpul transportului și după aceea, mărindu-le la valoarea comercială și cea utilă. Petalele florilor, ca și frunzele acestora se ofilesc uneori de timpuriu deoarece după tăiere se înmulțesc oxidările și în consecință și numărul de radicali periculoși. Dacă prin controlul unor promotori specifici se poate obține o supraexprimare a genei SOD, florile ar putea să rămână proaspete în depozit o perioadă foarte lungă de timp (fig. 219a).

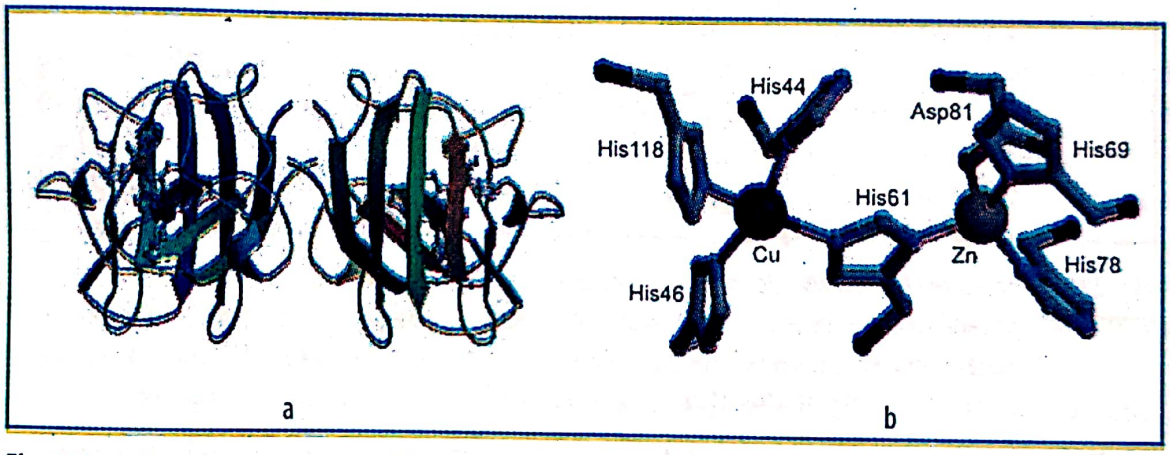


Fig. 219 – Reprezentarea genetică (a) și spațială (b) a superoxiddimutazei (SOD)

4.10.1. Îmbunătățirea calității fructelor

De fiecare dată cercetătorii se gândesc la problemele pe care le au producătorii în valorificarea unor produse perisabile cum sunt fructele, legumele etc. Mari probleme apar la transportul fructelor, mai ales în timpul transportului, timp în care acestea pot ajunge la o supramaturare, căpătând un aspect neplăcut (se spune că fructele se prăbușesc, devin moi, își lasă repede sucul). Aceste modificări se datoresc unor procese naturale de supramaturare, cunoscute și sub denumirea de senescență. Cauza este următoarea: în timpul maturării fructelor, printre altele este indusă gena care codifică enzimele: celulaza și poligalacturonaza; devine logic să gândim că procesul de maturare rapidă poate fi întârziat dacă expresia uneia sau alteia dintre genele implicate este blocată. Realizarea practică a acestei tehnici se obține prin fabricarea unei versiuni ARN-antisense a acestor gene.

În experiențele efectuate pe plante de tomate s-a aplicat această tehnică prin care s-a putut reduce conținutul de poligalacturonază cu 90% și în consecință activitatea acesteia. Ideea a fost excelentă conducând azi la reducerea cu peste 35% a pierderilor unei producții de tomate care în SUA se ridică la cca 1,5 miliarde USD.

Scanned with OKEN Scanner

Mai aproape de practicile agricole românești, amintim aici utilizarea produsului ETILENĂ care induce exprimarea unor serii de gene care, dimpotivă, participă la maturarea mai timpurie a tomatelor, în vederea apariției lor mai devreme pe piață. Aceasta rezultă din S-adenosilmetionin printr-o legătură intermediară cu 1 aminoaciddopropan - 1 - acid carboxilic (A.c.c.) - figura 220.

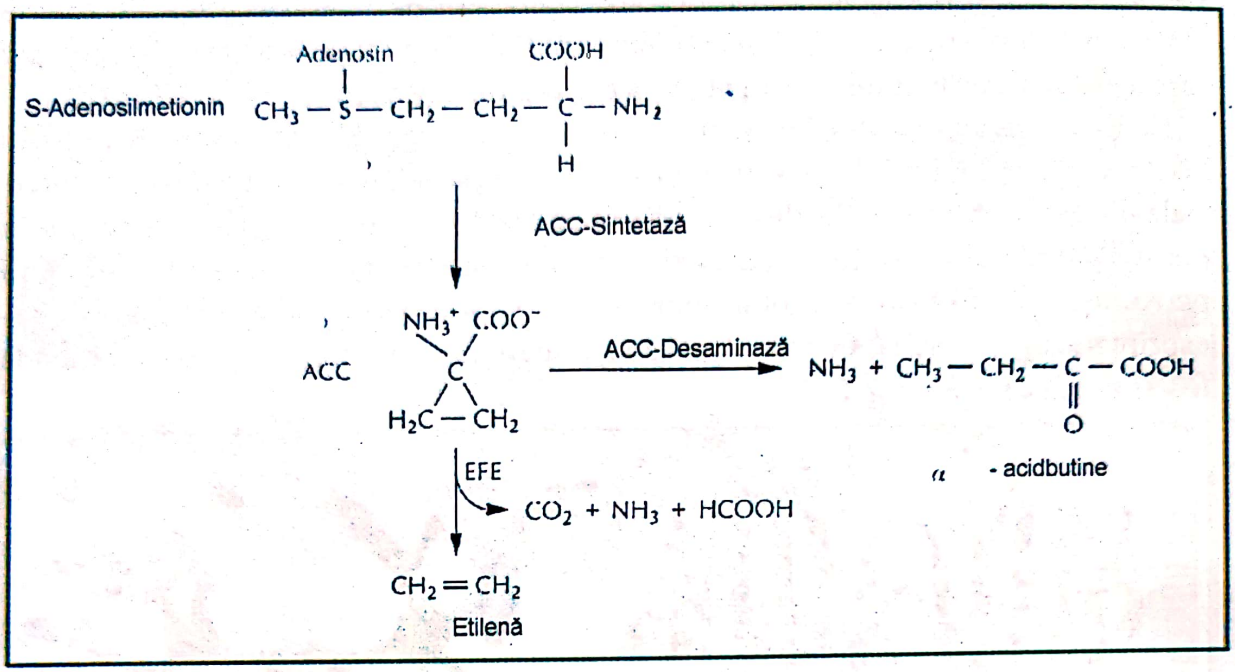


Fig. 220 – Inhibarea sintezei etilenice prin desaminază A.cc.
Enzima creatoare de etilenă (EFE) transformă 1-aminocyclopropan-carboxilacidul (Acc) în etilenă. Dacă enzima Acc-desaminasă este disponibilă, atunci apare o concurență Acc - EFE dominată de prima și care se finalizează reactiv cu formarea amoniacului și a α ketobutiratului, în locul etilenei

Dacă culturile sunt tratate de data aceasta cu produse chimice care blochează producția de etilenă, atunci poate fi întârziată atât maturarea fructelor cât și învechirea lor. Din punct de vedere al gustului și calității fructelor este de preferat ca acestea să nu fie grăbite prin formarea etilenei, pentru a avea timp să acumuleze zaharuri, arome și alte substanțe hrănitoare. Pentru aceasta practic trebuie blocată formarea etilenei.

Pentru a realiza această tehnologie vom lucra astfel:

- Se selectează din multitudinea de bacterii ale solului numai acelea care pot degrada substanța a-aminociclopropan-1-acid carboxilic.
- Se izolează apoi gena care exprimă enzima 1-aminociclopropan-1-acid carboxil-desaminază (A.c.c.)
- Aceasta se fuzionează, se cuplează cu promotorul 35-S (p 35S).
- Ti-plasmidul astfel obținut se induce în plantele de tomate.
- Plantele transgene vor sintetiza mai puțină etilenă decât plantele normale, iar fructele obținute pe această cale vor putea să fie păstrate o vreme foarte îndelungată.

În mod similar pot fi create plante transgenice care conțin mai mult glucozid sau mai mulți brasicosteroizi, substanțe cu caracter biostimulator, dar în egală măsură protector împotriva diferiților factori de stres între care căldura, seceta și radiațiile joacă un rol important (fig. 221).

Scanned with OKEN Scanner

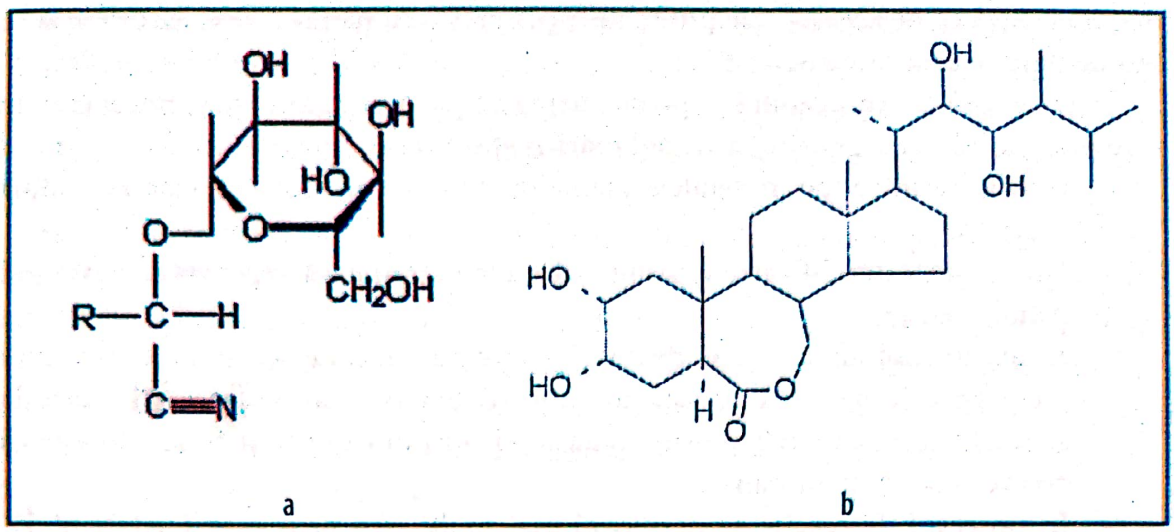


Fig. 221 – Formula structurală generică primară a unui glucozid.
O structură glucozidică se prezintă ca înlănţuire de molecule primare (a) şi a unui brasinosteroid (b)

Numărul produselor naturale existente în diferite plante este foarte mare. Până în prezent au fost descoperite în diferite plante peste 29 de gene care exprimă diferite forme de brasinosteroizi. În unele cariophilaceae cum ar fi *Lycnis viscario* se găsesc cele mai productive gene. Ele pot fi extrase şi induse altor specii de plante de cultură pentru a le mări rezistenţa la stres ori la boli. Gena existentă în Lycnis şi care induce o rezistenţă sporită a plantelor la boli este denumită CITOCROM-450. Lipsa rezistenţei culturilor la boli în mod deosebit se datorează unor proteine mutante care blochează exprimarea acestei gene. Aceeaşi genă blochează şi sinteza brasinosteroizilor (B.R.) şi deci induce sensibilitatea plantelor la boli. Pentru a elimina acest neajuns există 2 soluţii:

- fie se stropesc culturile cu concentraţii mici de brasinoisteroizi care blochează proteinele rele;
- fie se apelează la o altă genă care să decupleze acţiunea proteinei inhibitoare a rezistenţei.

Gena care accelerează în *Lycnis vulgaris* sinteza BR este cunoscută sub denumirea de BR.U.1 iar ea activează xiloglucanendotransglicosilaza, implicată în creşterea tulpinii. Experimente efectuate tot pe tomate au demonstrat că din cauza blocării sintezei acestor fitohormoni regulatori, a avut loc o alungire necontrolată a lăstarilor cunoscută sub denumirea de dwarfism, o fertilitate redusă şi o maturare mult întârziată. Efectele fiziologice ale inducerii brasinosteroizilor sunt foarte mari. Enumerăm câteva dintre ele:

a) diminuarea semnificativă a stresului la frig;
b) diminuarea stresului la căldură, mai ales la plantele sensibile;
c) diminuarea stresului la săruri, poluanţi, pesticide;
d) mărirea rezistenţei la boli.

Detalii asupra activităţii genelor BR41 şi CITOCROM-450 găsiţi în articolul „Inducerea rezistenţei şi toleranţei plantelor de cultură faţă de boli şi dăunători" - *M. Berca, Agricultorul român, 2001.* Rezultatele din China, Africa de Sud, America

Scanned with OKEN Scanner

demonstrează că pe această cale producţiile pot creşte cu până la 30%, iar calitatea se îmbunătăţeşte semnificativ.

În concluzie la acest capitol se poate afirma că plantele sunt organisme eucariote care pot fi modificate genetic în scopul măririi eficienţei lor economice.

- Genele se introduc în celulele plantelor după ce au fost cultivate în culturi speciale.
- Din celulele modificate, transformate, plantele pot să regenereze devenind plante transgenice.
- Anumite suşe ale bacteriei de sol *Agrobacterium tumefaciens* sunt cele care oferă pe cale naturală această modificare genetică. Bacteria reacţionează la semnale chimice chiar pe suprafaţa unei porţiuni rănite şi se străduieşte să creeze acolo o membrană.
- În procesul de reacţie se derulează mai mulţi paşi prin care T-ADN-ul Ti-plasmidului bacterian ajunge în nucleul celulelor plantei.
- După integrarea T-ADN-ului în genomul plantelor, genele de interes sunt activate.
- T-ADN-ul conţine genele care i s-au indus şi care produc în plante enzime pentru producţie şi calitatea ei precum şi fitohormoni care reglementează asemenea sistemului imunitar la mamifere rezistenţa plantelor la stresuri şi boli.
- *Agrobacterium tumefaciens* prin inducerea unui cod (T-ADN-genă) în celulele plantelor au dezvoltat un mecanism care a transformat celula într-o fabrică de bioxid de carbon şi azot accesibil pe care numai bacteria însăşi le poate utiliza.
- Sistemul Ti-plasmidic al lui *Agrobacterium tumefaciens* a putut fi într-atât modificat încât cu ajutorul lui pot fi introduse în anumite celule ale plantelor gene clonate. Pentru aceasta au fost secţionate şi identificate secvenţe T-ADN care au fost introduse în vectorii (Ti-plasmidici) şi transferaţi sub formă de gene fitohormonale sau gene pentru schimbul de substanţe tip Opin. (Opinul este un produs de condensare al unui aminoacid cu zahăr sau acid ketonic). El este sintetizat în nodulii de pe rădăcinile plantelor.
- Secvenţele T-ADN modificate prin clonare pot să fie transferate şi să rămână stabile în bacteria *Escherichia coli.*
- Fiecare T-ADN clonat (genă clonată) aparţine ADN-ului plantei după ce a fost transferat cu ajutorul lui A.T. ca vector de transport.
- Uneori metoda transferului cu T-ADN nu poate fi aplicată. Aşa cum s-a arătat în aceste cazuri, în majoritate la monocotiledonate se vor folosi alte metode cum ar fi bombardamentul cu microproiectile ADN (biolistică). ■

4.11. CÂTEVA ELEMENTE PRIVIND GENOMUL PLANTELOR

S-a arătat în capitolul anterior că numeroase gene de interes, extrem de valoroase se găsesc în natură. Nu o dată am afirmat că în cercetare „atunci când îţi este greu trebuie să te întorci la natură şi dacă ştii să cauţi bine, vei găsi întotdeauna ceea ce doreşti".

Scanned with OKEN Scanner

Am vrut să afirmăm prin aceasta că natura, prin numeroasele şi extrem de diversificatele ei funcţii creatoare, deţine „toate soluţiile". Pentru acest motiv, ultimii ani au constituit pentru cercetători o adevărată „alergătură pentru depistarea a noi gene de interes, gene utile, gene care exprimă caractere foarte cerute şi care au şi o mare valoare comercială".

Apriori, cercetătorii s-au preocupat de descifrarea şi cartarea genomului uman. După aceea a început o teribilă competiţie pentru descifrarea fiinţelor vii, pornind de la bacterii şi până la plante şi animale, găsindu-se un mare număr de gene de interes. Pentru aceasta este necesară cartarea genomului fiecărei plante. Până în prezent s-au făcut mari progrese în depistarea genomului plantelor de cultură, cum ar fi porumb, sorg, grâu, soia, bumbac, orez, pentru majoritatea dintre ele genomul fiind descifrat în procent de peste 70-80%. ■

4.11.1. Proiectul ARABIDOPSIS

Reprezintă o iniţiativă internaţională, un efort conjugat pentru secvenţionarea întregului genom al speciei *Arabidopsis thaliana* (gâscariţă), proiect finalizat la sfârşitul anilor 2002. Secvenţionarea a fost posibilă cu relativă uşurinţă pentru simplul motiv că planta este „uşor disponibilă" adică poate să se dezvolte de la germinaţia seminţelor până la maturitate în vase de reacţie, având şi o capacitate ridicată de înmulţire (8-10 săptămâni), precum şi un număr mare de descendenţi.

Scanarea genomului a condus la următoarele rezultate (parţiale, conform datelor noastre).

- 110 - 120 milioane perechi de baze;
- 25.000 gene codante - aşezate pe 5 cromozomi.

În comparaţie cu principalele plante de cultură precum rapiţa, sfecla, cartoful, grâul, porumbul sau orezul, genomul lui *Arabidopsis* este foarte mic.

Investigând genomurile plantelor de cultură, dar şi a peste 30 de specii ruderale, au putut fi colectate gene extrem de importante pentru ameliorarea biotehnologică a unor soiuri de cereale precum:

- Gene care măresc capacitatea fotosintetică, coeficientul de valorificare al apei şi elementelor nutritive conducând la creşterea producţiei (peste 50%).
- Gene care imprimă rezistenţa faţă de unii dăunători sau faţă de boli.
- Gene antistres prezentate anterior (Lexicon der Biologie).

Arabidopsis permite acceptarea uşoară şi conservarea în genomul ei a unor gene de interes prin AT, gene care pot fi conservate *in vitro* şi *in vivo* în laborator. Mai jos câteva fotografii ale acestei foarte importante plante.

Gena respectivă se află acum la banca internaţională de gene sub numele de AF 48.8771, AF 487459.

S-a observat, pe de altă parte, că anumite plante devin uneori rezistente la unele erbicide extrem de valoroase, denumite rezistente genetic. Prin efectuarea cartografierii genetice a biotipurilor rezistente şi separarea lor de cele nerezistente poate fi depistată gena care a creat această rezistenţă.

Scanned with OKEN Scanner

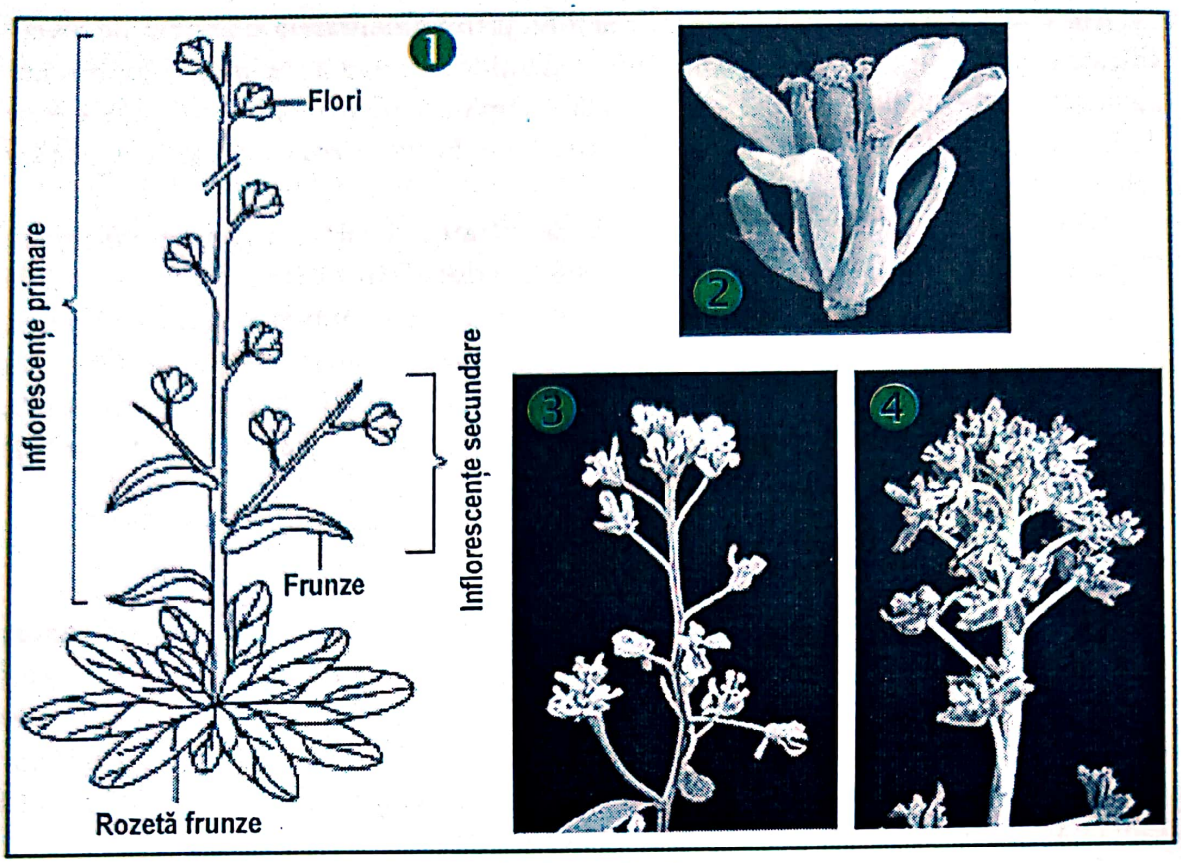


Fig. 222 – Arabidopsis thaliana – o buruiană dragă geneticienilor.
1. Prezentare schematică a plantei; 2. Floarea mărită la microsocop; 3 şi 4. Mutaţii care deţin gene de interes în conservare ce pot fi apoi transferate altor plante (*Lexicon der Biolologie, 2004*)

În figura 223 este prezentat un asemenea exemplu, studiindu-se comparativ biotipuri rezistente (AR) şi mediu rezistente (MR) la diferite erbicide ureice (SU) dar şi imidazolinone (IMI), triazolopyrimidines (TP), pyrimidinyl, thiobenzoates (PTB) şi sulfonilaminocarbonyltriayidinone (SCT).

Experienţele au fost efectuate de Park K.W. şi Mallory-Smith C.A. de la Universitatea de stat din Oregon (SUA) (Weed Research 44/2/2004). Gena de rezistenţă **als** poate fi conservată în *Arabidopsis* de unde poate fi preluată şi transferată oricărei plante de cultură care se doreşte rezistentă la erbicidele de mai sus (vezi şi tabelul 224).

Pentru depistarea genei care induce rezistenţa buruienilor la aceste importante erbicide s-au folosit metodele clasice de regulă PCR. Prin secvenţionare s-au obţinut 1749 - p - b - zone de codificare care exprimă 583 forme de aminoacizi. În general peste 90% din nucleotidele speciei BT erau asemănătoare celorlalte graminee.

Zona A-E reprezintă locaţia unde se aşază mutaţiile ce conferă rezistenţa **als**. Analiza secvenţei ADN pe această locaţie a genelor **als** a demonstrat existenţa unei mutaţii punctuale de la C la T a nucleotidei 328 aminoacidul prolină (Pro 197) fiind înlocuit cu serină (deplasare de la Pro→Ser).

S-a demonstrat în felul acesta că rezistenţa indusă de gena **als** se datorează acestei schimbări care are loc în biotipurile BT-AR, dar nu se găseşte în BT-AS. Schimbarea aceasta prolină - serină pe o genă **als** a indus fenomenul de rezistenţă şi la alte buruieni precum specii de *Lindernio, Amaranthus blitoides* şi specii de *Scoporia*.

Scanned with OKEN Scanner

Pentru a combate această rezistență chimic, este aproape imposibil, dozele trebuind mărite de 2-300 ori față de normal, ceea ce nu este permis nici ecologic și nici economic.

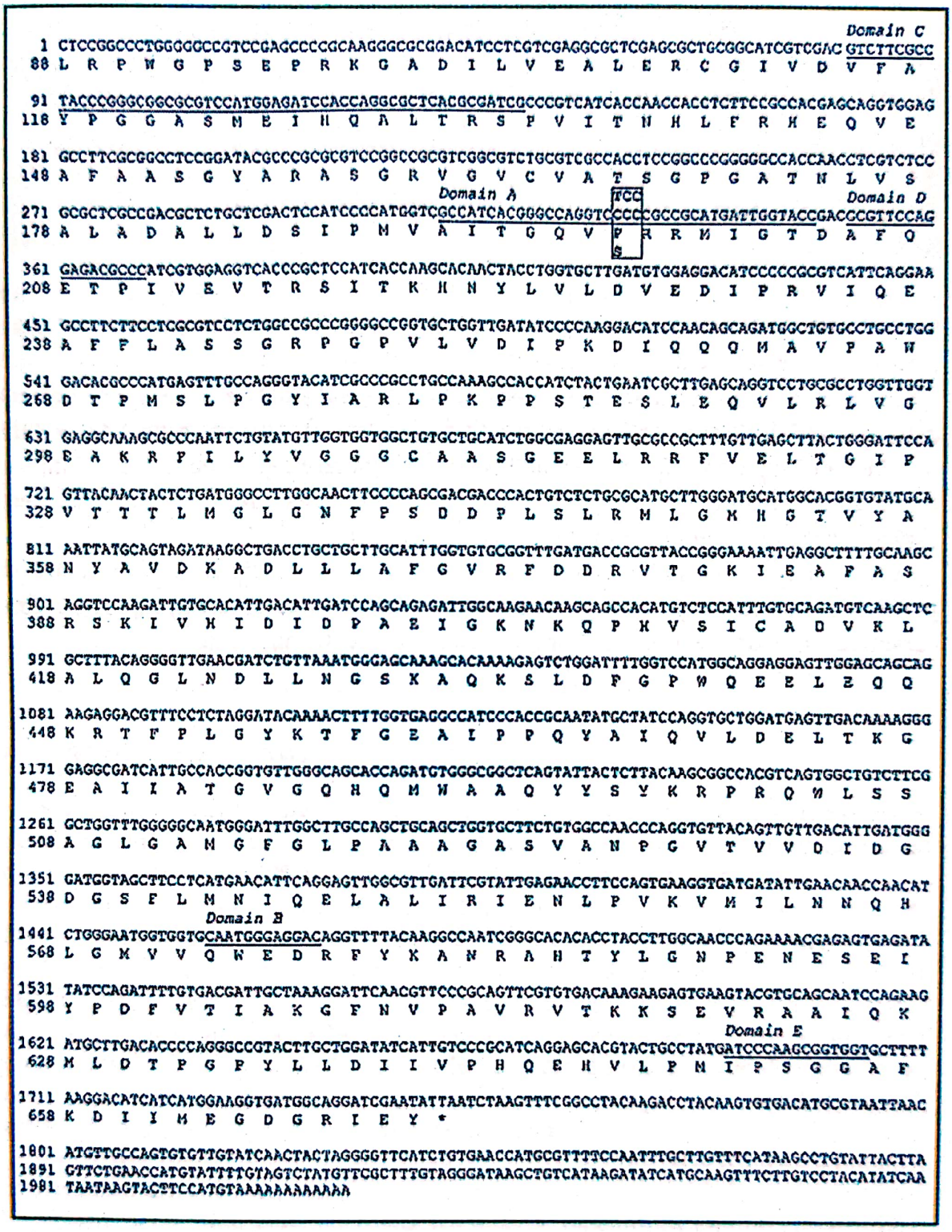


Fig. 223 – Secvență nucleotidă și un aminoacid suplimentar indus la biotipuri rezistente (AR) de *Bromus Tectorum*. Secvența colorată indică o regiune bine conservată care formează gena **als** a plantei, o genă nouă care creează o plantă mutantă. Mutația constă în deplasarea Pro către Ser a aminoacidului 197 în domeniul „O" de la biotipul AR. Pentru numărarea aminoacizilor s-a folosit gena **als** deja descifrată și bine cunoscută la *Arabidopsis thaliana*

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 224

Dozele de erbicid solicitate pentru distrugerea a 50% din buruieni, în condiţiile apariţiei mutantei als la AR şi MR, prin comparaţie cu cele sensibile AS şi US.

Erbicide	GR 50 (g s.a./ha-1)			
	AR	AS	MR	MS
Primisulfuron	228	0,7	32,5	1,9
Sulfosulfuron	2589	9,8	81,9	9,6
Propycarbozone-sodium	709	1,7	73,0	1,9
Imazomat	4,3	3,7	46,5	3,4

Aşa cum spuneam, rezistenţa genetică este rea când se induce buruienilor, dar este foarte bună când se induce unor plante de cultură sensibile care se tratează cu aceste erbicide, pentru că ele devin rezistente.

În practică se întâlnesc şi alte numeroase cazuri când plantele au componente ciudate, apărând de fiecare dată exprimarea unor caractere, fie favorabile, fie defavorabile pe care nu ni le putem explica. Făcând însă o cartografiere a genomului plantei atipice cu cel al unei plante normale, vom găsi cu siguranţă **gena, alela** care exprimă acest caracter, precum şi modul cum s-a format această genă.

Cunoaşterea genomului plantelor de cultură normale, tipice, este necesară şi pentru a cunoaşte locaţia unde poate fi plasată **gena de interes**, care să exprime optim caracterele noi, dorite de cercetător şi solicitate de practician. ■

Scanned with OKEN Scanner

5. TRANSFORMAREA GENETICĂ A ANIMALELOR ÎN SCOPUL MĂRIRII PRODUCȚIEI ȘI CALITĂȚII EI

S-a arătat deja într-un capitol anterior că animalele, ca și plantele de altfel, prin transformări genetice pot deveni adevărate bioreactoare în care se pot obține substanțe medicamentoase extrem de valoroase ca și alte substanțe foarte utile, foarte greu, dacă nu imposibil de obținut pe altă cale.

În figura 225 s-a prezentat o schemă a modului în care pot fi obținute organismele transgenice atât la animale cât și la om, ca și modul în care se pot obține celule modificate genetic, curative în scopul implementării lor pentru combaterea anumitor boli. S-a arătat de asemenea modul în care se obțin celulele clonate care conțin genele active funcțional ce trebuie introduse în oganismele superioare. Tehnica inducerii acestor gene se supune următoarelor principii pe care le repetăm sintetizat:

1) Se injectează o genă clonată în nucleul celulei reieșite prin fecundare (celula zigot) - operațiunea se face *in vitro*.
2) Se implementează tânărul embrion într-un animal feminin purtător. El nu se poate dezvolta decât aici sau mai nou, în întregime *in vitro*.
3) Unii, dar nu toți urmașii zigotului implementat, vor purta genele clonate în toate celulele.
4) Din animalele purtătoare ale genei clonate se selecționează noile linii genetice.

Vom exemplifica pe câteva specii de animale utile. ■

5.1. OBȚINEREA BOVINELOR TRANSGENICE

Studiile sunt orientate spre creșterea producției de lapte, spre modificarea și îmbunătățirea calității laptelui dar și a calității cărnii și chiar a pieilor. Procedeul utilizat este prezentat în figura 225 și conform legendei de la această figură.

Până în prezent însă rentabilitatea metodei obținute în diverse experimente este foarte redusă și anume de 0,08%, adică 2 vieți transgenice la o fecundare de 2470 ovule. În ultimul timp cercetătorii au reușit însă să obțină performanțe mult mai mari. Pentru aceasta, depistarea transgenității nu se face după fătarea vițelului și scanarea ADN-ului ci prin prelevarea încă din „vitro" a unei celule embrionare și studierea transgenității în această fază. Se elimină în acest caz un mare volum de muncă și se reduc considerabil costurile. În fond, animalul purtător va primi în uterul său numai embrion transgenic și va naște numai viței transgenici.

Domeniile de interes în această zonă au fost prezentate mai sus. În continuare, aducem câteva completări acestora:

1) Obținerea unui lapte cu o altă compoziție biochimică față de cea naturală, pentru scopuri specifice.
   a) Lapte cu un procent mai mare x-caseină, care conduce implicit la obținerea unei cantități mai mari de brânză, respectiv telemea. Cum caseina este o proteină tehnic-genetică, se folosește o transgenă x-caseină supraexprimabilă. O asemenea construcție este asemănătoare cu cea a obținerii β-caseinei la capre (fig. 226) și este foarte posibilă și pentru x-caseină.

Scanned with OKEN Scanner

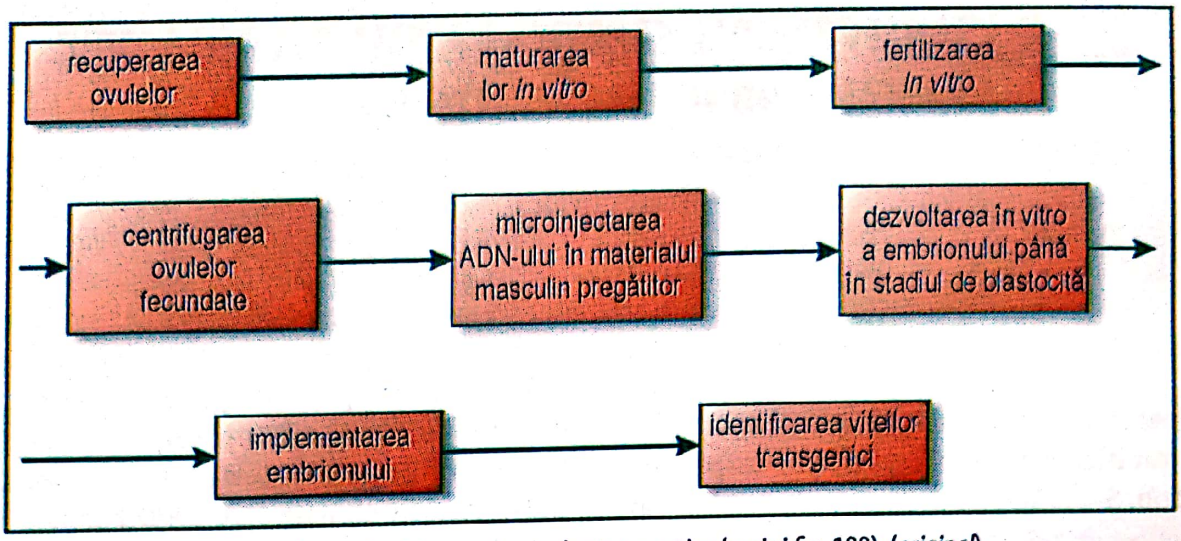


Fig. 225 – Schema procedeului de obţinere a bovinelor transgenice (vezi şi fig. 198) (*original*).
a) Se extrag ovulele de la vacile abatorizate din diferite motive. Se preferă ovule de la animalele mai tinere.
b) Ovulele se supun unui proces de maturare şi uniformizare *in vitro*.
c) Tot *in vitro* se realizează fertilizarea.
d) Ovulele fecundate se supun apoi unui proces de centrifugare care conduce la eliminarea părţii nutritive (bonului) altminteri ar fi îngreunată depozitarea nucleului celulei masculine în care se injectează sub microscop noua construcţie genetică.
e) Se injectează noua construcţie ADN în nucleul masculin.
f) Se dezvoltă *in vitro* noul embrion.
g) Fiecare embrion este transferat în uterul unui animal purtător, sincronizat în acest scop.
h) Se realizează screening-ul ADN pentru depistarea tinerelor animale transgenice

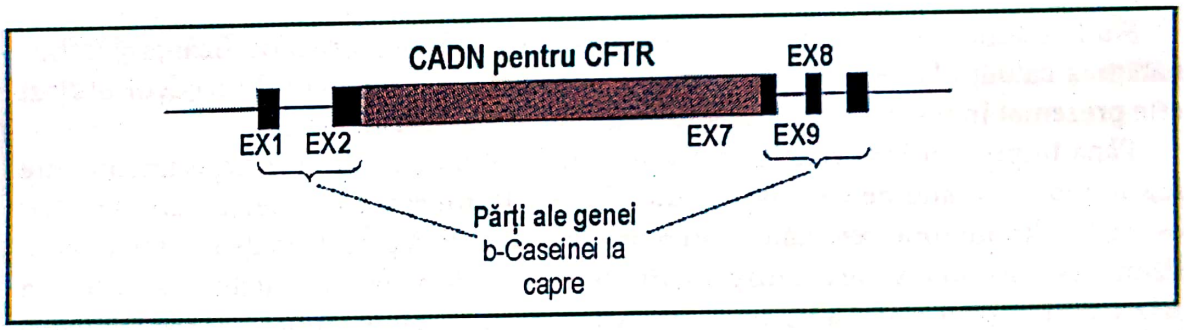


Fig. 226 – Construcţia modulului de exprimare al genei β-caseină la capre.
Se observă că aceasta este cuplată cu C-ADN-ul CFTR. Prin CFTR se înţelege Cyblic Fibrosion Transmembrane Regulator (regulator transmembranic al fibrozei cistice).
O boală ereditară care se poate trata, fie prin consumul laptelui de capră, fie prin extragerea proteinei regulatoare şi aplicarea ei pe alte căi. Promotorii secvenţei terminale a transcripţiei ai genei B.C. sunt exonii 1, 8 şi 9 (*prelucrare după Lexikon der Biologie, 2004*)

2) Reducerea cantităţii de lactoză din lapte poate fi de asemenea obţinută prin inducerea unei gene care să reducă sau să elimine producerea de zahăr în lapte. Acest lapte (dietetic) este util bolnavilor de diabet ca şi celor cu intoleranţă la lactoză.
3) Obţinerea unor animale rezistente la diferite boli provocate de bacterii, virusuri, endo şi ectoparaziţi. Este vorba practic de o imunizare a lor.

Scanned with OKEN Scanner

a) S-au obţinut deja gene ca şi animale transgenice rezistente la mastită pentru bovine, dizenterie la porci şi holeră la găini.

Cu toate acestea, expresia unor asemenea gene nu este încă sigură, nu toate animalele căpătând rezistenţa necesară. De aceea, procedeele clasice de vaccinarea animalelor sunt mult mai larg utilizate în practică, ele fiind cu mult mai ieftine.

Pe de altă parte, se pune problema renunţării în Uniunea Europeană la vaccinuri, ceea ce va aduce în mare actualittate rezistenţa indusă genetic. În momentul scrierii acestor rânduri, unul din cei mai mari crescători de porci din România, şi anume Agricola Internaţional Bacău, este obligat să distrugă cel puţin 100.000 de porci din cauza unei persistente infecţii cu virusul E.P. care nu mai poate fi combătut din cauza unor forme foarte rezistente selecţionate de-a lungul anilor în crescătorie.

Pierderi mari provoacă crescătorilor de porci şi pesta porcină, pentru care în UE, şi mai recent în România, nu mai sunt permise vaccinările. Se revine în aceste condiţii la gene rezistente, cu precizarea că se încearcă crearea unor animale transgene, în care nu numai o genă este indusă ci şi un complex de gene rezistente la infecţii (ECORI).

Pentru dezvoltarea unei rezistenţe reale, este absolut necesară crearea unor linii de selecţie ameliorativă, care să fie insensibilă la agenţii patogeni şi care să aibă la bază o imunizare cu transmitere genetică bazată pe transferul unor gene. O serie întreagă de gene care participă la imunosistem, cum ar fi genele **histocompatibile importante** denumite şi celulele T - gen-receptoare ca şi genele limfocinice sunt actualmente cercetate cu mare atenţie. Rezultatele reieşite până în prezent din diferite cercetări promit efecte notabile la acele gene care codifică lanţurile uşoare şi grele ale unor anticorpi monoclonali.

Această strategie are la bază ideea că animalele transgene sunt dotate cu un mecanism biologic genetic transmisibil, deja înglobat şi, ca urmare, o imunizare prin vaccinuri ar fi inutilă.

Metoda cunoscută sub denumirea „imunizare *in vivo*" presupune utilizarea prin introducerea într-un organism a unor gene pentru un anumit anticorp care se leagă de o antigenă specifică. Pentru a se testa acest lucru s-a utilizat o genă destinată lanţului de imunoglobuline ale unui anticorp monoclonal la şobolani versus unui anticorp care se leagă la 4 hidroxinitrofenil acetat.

Acest complex ordonat în tandem a fost clonat şi apoi injectat în ovulele fecundate obţinute de la şoareci, iepuri şi porci. În absolut toate cazurile serul obţinut de la animalele transgene a conţinut anticorpi monoclonaţi cu funcţii foarte active cu toate că, cantitatea de anticorpi clonaţi conţinuţi atât pentru lanţurile grele cât şi pentru cele uşoare se găseau în cantităţi foarte mici.

În acest moment, pentru a finaliza lucrarea şi a constata dacă această problemă poate sau nu să fie rezolvată, se lucreează cu rezultate pozitive la testarea unor noi construcţii genetice. ■

5.2. ORGANISME MODIFICATE GENETIC LA OI, CAPRE ŞI PORCI

S-a arătat deja că modificarea genetică şi crearea organismelor transgenice la capre şi oi se utilizează în primul rând în scopul obţinerii prin intermediul laptelui a unor produse medicamentoase de mare valoare. De aceea, cercetările s-au concentrat cu priori-

Scanned with OKEN Scanner

tate asupra glandelor mamare care secretă acest lapte, încercându-se a le transforma în veritabile bioreactoare, fabricante ale unor proteine de mare valoare terapeutică.

Chiar dacă cele două specii luate în studiu produc pe an numai câteva sute de litri de lapte, cu mult mai puţin decât o vacă, folosindu-se o construcţie specială de gene, prin intermediul glandelor mamare specifice prin care se induc anumiţi promotori ce coordonează secvenţele genelor umane, s-au putut „construi" sau „fabrica" capre şi oi transgenice care produc în lapte anumite proteine foarte utile sănătăţii omului.

În tabelul 227 sunt prezentate genele implicate (transgenele) induse în glandele lactifere.

Obţinerea proteinelor „acceptate" de organismul uman a fost realizată prin glucozilana celor din lapte, în aşa fel încât activitatea lor biologică a devenit foarte asemănătoare cu cea a proteinelor umane.

Există încă în derulare un număr mare de cercetări care ar trebui să demonstreze dacă proteinele obţinute în glandele lactice ale animalelor transgenice corespund unor forme naturale. În caz negativ, studiul lor ar trebui efectuat foarte atent, pentru că abaterile de la formele naturale ale proteinelor pot induce efecte secundare încă necunoscute, din cauza lipsei informaţiei provenită din cercetarea riguroasă.

Tabelul 227

Transgenele şi promotori înglobaţi în glandele lactifere ale diferitelor specii de animale (Bernard R.G. şi Jack J. Pasternak, 1995)

Transgene	Promotor	Organisme ţintă
Longer acting tissue plasminogen activator (activator plasminogen al ţesuturilor)	Zer-proteină (caseină) acidă	capră
α antitripsin	β Lactoglobulină	oaie
Factor de blocare a coagulării sângelui IX	β Lactoglobulină	oaie
CDu dizovabil	Zer-proteină acidă	şoarece
Lactoferină	α S1 - caseină	vacă
Urokinasă	α S1 - caseină	şoarece
CFTR	β - caseină	şoarece
Inter-leucină - 2	β - caseină	iepure

Expresia transgenelor în glandele producătoare de lapte nu s-a manifestat negativ la animalele din descendenţă care au supt laptele mamelor lor indiferent că au fost iezi sau miei. Unele fenomene negative au fost însă demonstrate în cazul utilizării genei hormonului de creştere la vite aflată sub controlul promotorului metalotionin atunci când acesta a fost introdus la porci.

În aceste cazuri, hormonii din aceiaşi grupă de creştere generaţi de gene induse la anumite grupe de porci au demonstrat o capacitate semnificativă de a îmbunătăţi indicele de conversie alimentară. Această realizare s-a corelat însă, din nefericire, şi cu apariţia unor probleme de sănătate cum ar fi ulcer stomacal, inflamaţie a rinichilor, deteriorări ale articulaţiilor, endocardite ca şi o sensibilitate la inflamaţiile pulmonare. Cauzele acestor simptome sunt încă necunoscute, dar ele se află în curs de investigare. Ar putea, ipotetic, să fie cauzate de urmările pe termen lung ale efectelor nefiziologice

Scanned with OKEN Scanner

ale ansamblului de hormoni de creştere foarte activi. Dar dacă cercetările de până acum nu au fost confirmate ca sigure, trebuie totuşi să recunoaştem că transferul efectuat la porc exprimă foarte bine hemoglobina umană, demonstrând o dată în plus marea apropiere dintre genomul uman şi cel al porcului.

Cu ajutorul unei construcţii ADN provenită din zona de control a mecanismului genei β-globulin s-a reuşit ca două gene α 1 globin - ca şi o a treia β^A-globin-genă să poată fi implementate la porc. Porcii experimentaţi s-au dezvoltat fără să dea semne de vreo slăbiciune, de vreo îmbolnăvire şi au produs în sângele lor cantităţi importante de hemoglobină. **Măsurătorile efectuate în laborator au confirmat faptul că hemoglobina indusă în sângele de porc prin implementarea la acest animal a genelor mai sus prezentate au avut exact aceiaşi parametri ca cea naturală prezentată în sângele omului.**

Criza de sânge existentă azi atât în România, cât şi în alte ţări ar putea şi va putea în curând să fie eliminată pe această cale, sângele uman putând fi obţinut prin transgeneză la porc, deşi pentru purificarea acestuia mai este încă mult de făcut. Să nu uităm însă că procedeul biotehnologic a putut fi extins de o manieră fantastică, fiind astăzi posibil prin transgeneză să obţinem organe de porc precum ficatul şi rinichiul uşor transferabile la om, rezolvându-se a doua mare criză, aceea a crizei de organe. Asemenea experimente şi programe se derulează astăzi şi în România. ■

5.3. CELULE DE ORIGINE SAU DE BAZĂ – CLONAREA MAMIFERELOR, OBŢINEREA LUI DOLLY

Deşi în practică biotehnologiile n-ar trebui să ţintească clonarea somatică a animalelor sau poate a omului, această temă preocupă din ce în ce mai mult lumea ştiinţifică atât de iscoditoare, nu puţini fiind aceia care ar plăti multe milioane sau miliarde de dolari pentru a-şi asigura o continuitate eternă în viaţă folosind această cale. Într-un capitol special vom discuta problemele de etică pe care le implică acest fenomen.

La baza clonărilor stau celulele de origine sau de bază şi despre ele am scris frecvent în această lucrare.

Celulele de origine, de bază sau de pornire (starter) au două însuşiri de bază, şi anume:

- Sunt relativ nespecializate şi se înmulţesc în permanenţă. În anumite condiţii specifice se diferenţiază şi formează celule specifice de un anumit tip sau de mai multe tipuri diferite. În corpul unui adult se găsesc numeroase forme de celule de origine. Rolul lor este acela ca în caz de criză a unor celule funcţionale, neproductive, acestea pur şi simplu să le înlocuiască. Un exemplu concret în acest sens îl constituie celulele de origine din măduva osoasă care stau la baza înlocuirii tuturor celulelor sângelui (fig. 228) sau numai din sânge (fig. 229).

Un alt exemplu depistat recent de cercetători şi a cărui descoperire începe să revoluţioneze biotehnologiile constă în depistarea unor celule bazale chiar în măsură să producă anumite forme de celule nervoase. Celule de origine din care pot fi dezvoltate mai multe tipuri de celule sunt denumite „multipotenti" sau „pluripotenti".

Scanned with OKEN Scanner

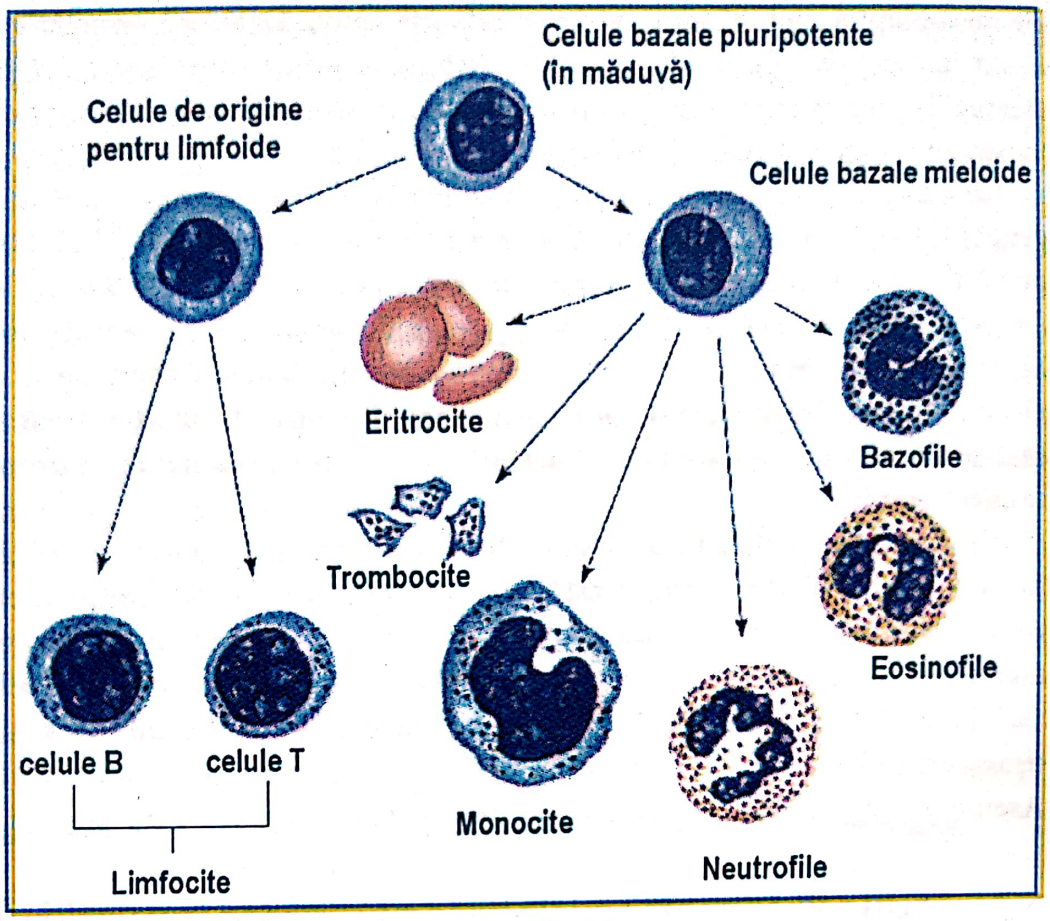


Fig. 228 – Diferenţierea celulelor sângelui pornind de la celule de origine.
Toate celulele sângelui se dezvoltă din aceeaşi „sursă" care este constituită dintr-o populaţie de celule de origine plenipotenţiale situată în măduva roşie şi care constituie punctul de plecare, startul pentru diferenţierea celorlalte celule ale sângelui după ce se trece printr-o fază intermediară în care se diferenţiază cele două grupe - limfoidele şi mieloidele (*după Neil Campbell şi colab., 2003*)

Celulele de origine par a nu exista numai în măduva osoasă sau în creier. Celulele de bază, deşi puţine ca număr, apar în cercul cercetării pe măsură ce cercetătorii iniţiază un număr tot mai mare de celule. Foarte recent, o echipă formată din trei cercetători, condusă de Tim McCaffrey de la Universitatea George Washington din Washington, au descoperit că celulele albe, izolate din sângele uman pot fi folosite şi ca celule bazale, de pornire la fabricarea unor celule ale măduvei osoase. Procesul se prezintă deci invers decât cel prezentat în figura 228 (fig. 229).

Procedeul investigat de cercetătorii americani a căpătat denumirea de „transformare miraculoasă". Această transformare este legată de un anticorp special. Prin intermediul unui receptor el se leagă de suprafaţa unei celule leucocite. Acest complex elaborează şi transmite în lanţ anumite semnale către nucleul celulei. Ca feed-back, celula primeşte în egală măsură ordin să se diferenţieze.

În concepţia lui Abuljadayel, unul din componenţii echipei de cercetare, o celulă matură se dezvoltă în sens invers, în stadiul devenirii ei într-o celulă de origine pluripotentă, care poate apoi produce celule pentru toate ţesuturile corpului. Noi deducem de aici că nu este exclus ca celula leucocită să parcurgă un sens invers celulei prezentat în figura 228 şi să acţioneze ca una de origine din care ea însăşi s-a format.

Scanned with OKEN Scanner

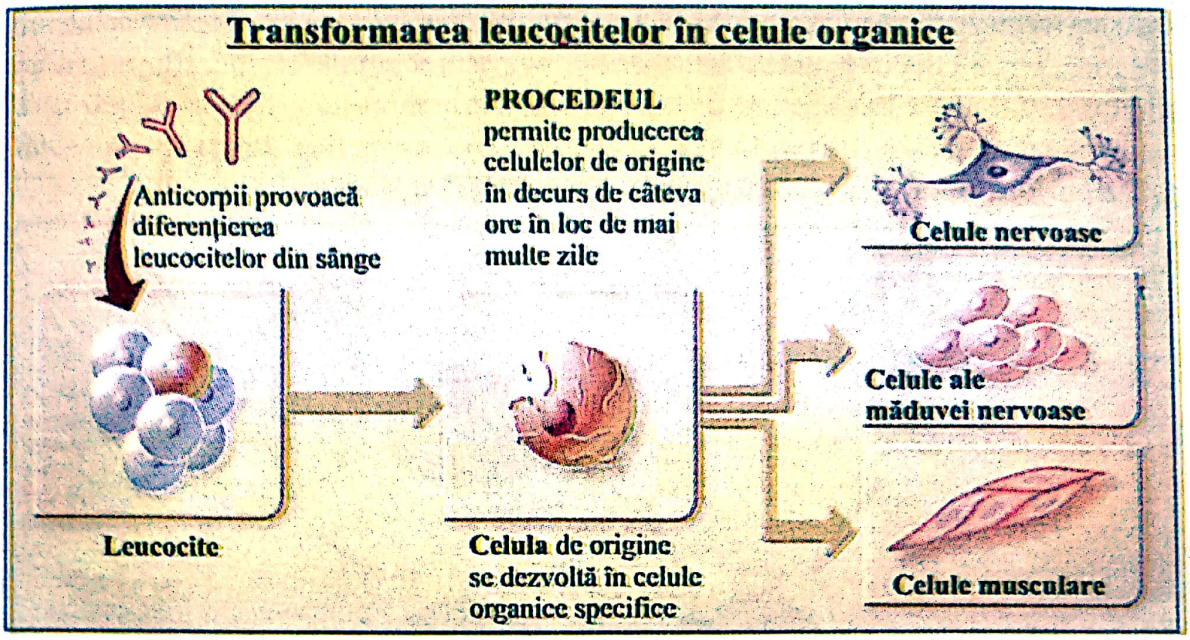


Fig. 229 – Leucocitele ca celule de origine pot produce diferite celule organice. Ele pot fi considerate celule de bază adulte şi funcţionează pe principiul prezentat în figurile 169 şi 223 (*după Michael Dechenwald, Focus 2003, decembrie, nr. 50, p.112*)

Fenomenul a fost definit de cercetători "retrodiferenţiere" şi el este studiat de mai mulţi ani. Cercetările efectuate tot pe şoareci au demonstrat că celulele se transformă în celule asemănătoare celor ale măduvei rozătoarelor şi produc toate tipurile de celule ce se află în sângele uman.

Prin acest procedeu s-a demonstrat obţinerea cu mai mare uşurinţă a unui număr foarte mare de celule specifice ţesuturilor inimii, muşchilor, nervilor, ficatului, măduvei etc., putând conduce în viitor la combaterea a numeroase boli ca leucemia, infarctul, scleroza multiplă, blocajele organice sau căderea imunosistemului. Problemele etice în acest caz sunt mult mai reduse pentru că sângele se recoltează de la pacienţi. Restul se întâmplă în laborator.

Cercetătorii consideră că atât în corpul uman, cât şi în cel al animalelor există puţine celule de bază, dar acest lucru nu-i împiedică să caute mereu altele, o alergătură similară cu cea iniţiată pentru depistarea genelor de interes. Cu toate acestea, cercetătorii încearcă acum ca din celulele pluripotenti să poată obţine cât mai multe **„tipuri reparatorii"** am spune noi.

După identificarea celulelor bazale, cercetătorii le izolează şi apoi încearcă, şi au reuşit foarte frecvent, să diferenţieze celule ale ţesuturilor de regulă prin cultivarea lor pe medii de cultură specifice.

Celulele embrionare se lasă mult mai uşor cultivate pe medii şi ele pot fi considerate „totipotenţiale" sau celule bazale de origine embrionară pentru că pornind de la ele, prin dirijare enzimatică, prin utilizarea unor factori de creştere şi folosind medii de cultură dirijante se poate ajunge la orice tipuri de celule utile (figurile 171 şi 230).

S-a arătat într-un capitol anterior că utilizarea acestor tehnici pune la dispoziţia medicinei posibilitatea reparării, a redării funcţiunilor complete ale unui organ

Scanned with OKEN Scanner

distrus - celule pancreatice pot înlocui sau repara pancreasul, iar producerea celulelor nervoase poate înlocui pe cele afectate de boli grave precum Parkinson, Chorea Huntington sau chiar pe cele afectate de diferite atacuri cerebrale.

În cazul unei clone de tipul Dolly, celula de pornire este fie o celulă somatică, fie una embrionară, care, ca și în cazul de mai sus, se lasă mai ușor clonată.

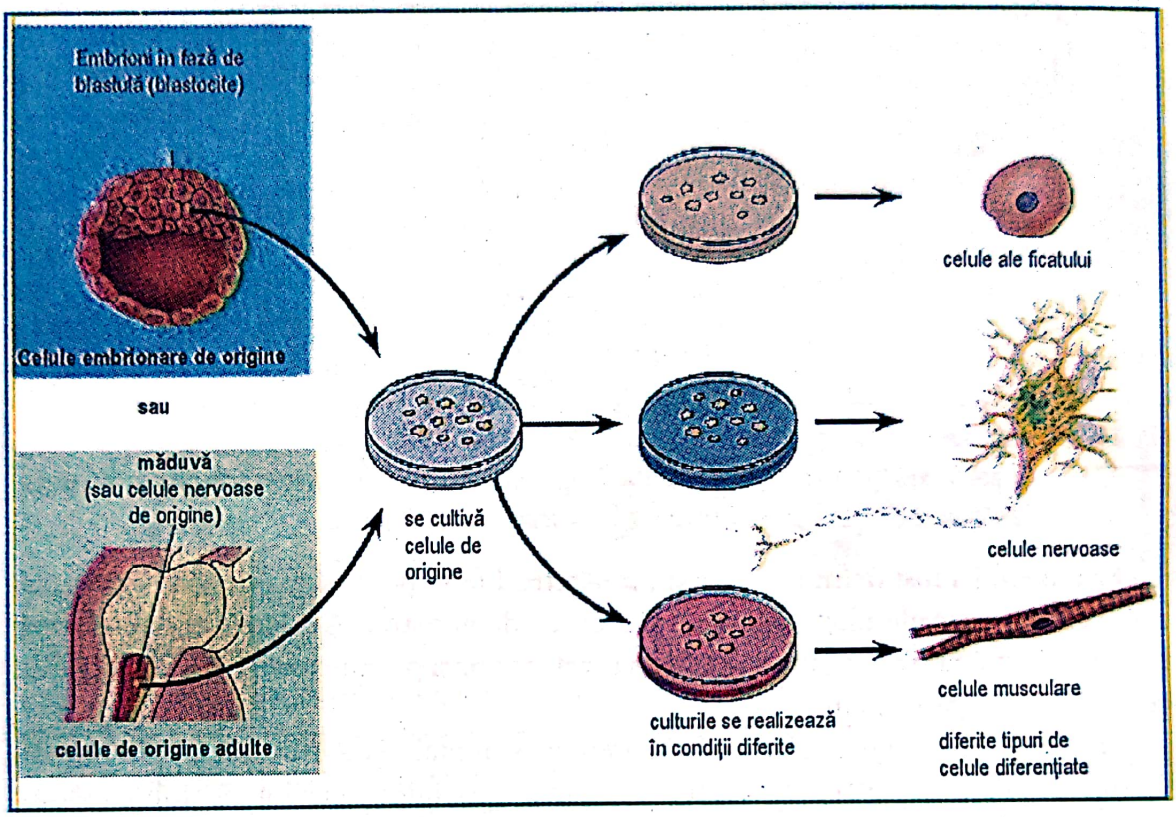


Fig. 230 – Schemă generală a diferențierii celulelor specializate pornind de la celulele de origine. Această figură se aseamănă cu figura 229, cu precizarea că se prezintă aici modul schematic de cultivare a celulelor de origine și intervențiile specifice pentru diferențierea lor (*ilustrație prelucrată după Campbell și colab., 2003*)

În cazul clonelor, celula bazală este fie o celulă somatică adultă, fie o celulă embrionară. Fabricarea clonelor prin tehnologiile moderne se realizează prin așa-numitul fenomen al „transplantării nucleare".

În anul 1977, cercetătorul scoțian Ian Wilmut și colaboratorii săi au anunțat clonarea unui animal adult. Pentru această reușită ei au folosit următorul procedeu:

- Au extras nucleul dintr-o celulă a ugerului unei oi.
- Au introdus acest nucleu, adică l-au transplantat într-un ovul nefecundat al altei oi (fig. 231). Se observă că nu a fost folosită nici o celulă de la un individ masculin.
- Separarea absolut necesară și identificarea nucleului s-a făcut prin introducerea celulelor recoltate din glanda de lactație, într-un mediu de cultură. În felul acesta, ciclul de înmulțire al celulei a fost stopat și adus în faza Go.
- Faza următoare a constat din ameliorarea celulelor somatice cu celule ovule cărora li s-a extras nucleul.

Scanned with OKEN Scanner

Au rezultat celule diploide care au început să se înmulţească. S-a format un **embrion** care în faza timpurie a fost implantat în uterul unei oi purtătoare. De fapt, s-au implantat mai multe sute de embrioni, dar firește, numai unul şi-a continuat dezvoltarea deplină.

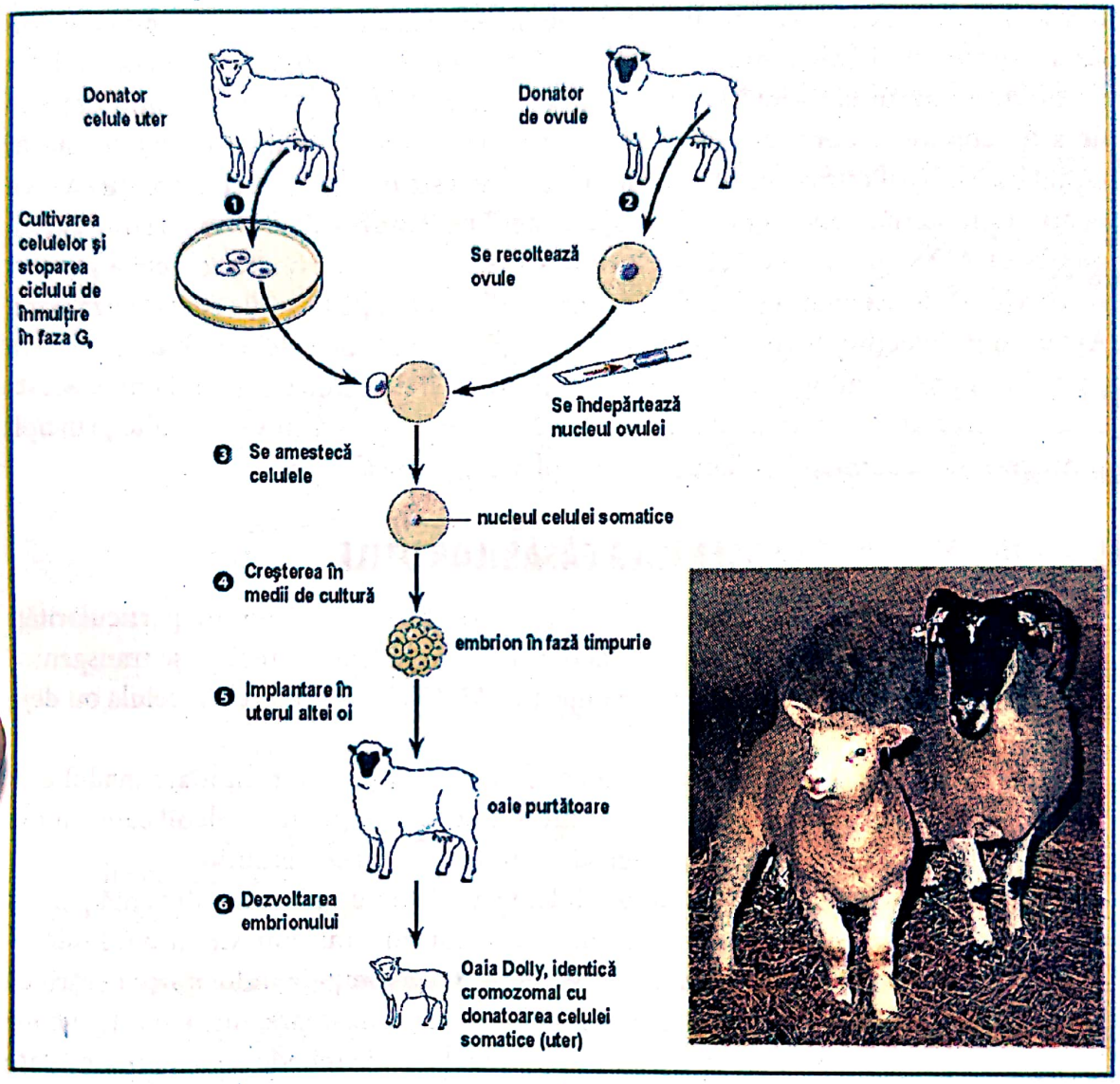


Fig. 231 – Obţinerea prin clonare somatică a oii Dolly.
Similar se poate proceda la toate mamiferele.
1. Se extrag celule din ugerul unei oi, se cultivă pe mediu şi se stabilizează celula în faza Go (nucleu întreg nediferenţiat).
2. Se extrag ovulele de la o altă oaie cărora şi se înlătură nucleul.
3. Se amestecă celulele somatice în faza Go cu ovulele fără nucleu.
4. După cca 6 zile de creştere apar embrioni în faza timpurie.
5. Aceştia sunt implementaţi în uterul unei oi purtătoare. Un singur embrion s-a dezvoltat.
6. După perioada de dezvoltare apare pe lume oaia Dolly, care are un ADN aproape identic cu al donatoarei celulelor somatice (uger)

S-a născut oaia Dolly, iar după efectuarea analizelor ADN, s-a constatat că ADN-ul clonei este identic cu al donatoarei nucleului (celula somatică din uger). De fapt,

Scanned with OKEN Scanner

genele lui Dolly nu au fost 100% identice cu ale donatoarei nucleului deoarece ADN-ul mitocondrial provine de la donatoarea ovulului. În fotografie se observă Dolly (stânga) cu mama sa purtătoare, cu care, genetic, nu are nimic comun.

Între timp, în lume s-au realizat numeroase alte clone: la şoareci, la câini, la porci, la vite, la maimuţe şi poate chiar şi la oameni. Tehnica clonării somatice este departe de a fi perfectă şi ridică multe întrebări de natură etică ce vor fi discutate. Tehnic vorbind, numărul embrionilor clonaţi este extrem de mic, procedeul fiind departe de a fi economic. Cercetătorii au experimentat şi au găsit cauza: aceasta constă în faptul că ADN-ul numeroşilor embrioni clonă nu este metilat corect în sensul că s-au depistat un număr suplimentar de grupări metil pe lanţurile ADN. Or, se cunoaşte că metilarea ADN-ului influenţează exprimarea genelor. O exprimare corectă a genelor se corelează de asemenea şi cu plasarea grupărilor metil pe locaţiile corespunzătoare. Amândouă defecţiunile (prea multe grupări şi plasamente defecte) conduc la blocarea dezvoltării embrionilor sau la dezvoltarea parţială şi defectuoasă a lor. Pentru aceste corecţii cercetările continuă, dar în egală măsură mai avem de învăţat multe principii şi procese ale fenomenului denumit „dezvoltare biologică". ■

5.4. OBŢINEREA TRANSGENICĂ A PĂSĂRILOR UTILE

În procesul de reproducţie şi dezvoltare a păsărilor, există anumite particularităţi sau chiar ciudăţenii, care fac imposibilă obţinerea unor linii, a unor suşe transgenice prin metoda foarte răspândită a microinjecţiei ADN-ului de interes în celula ou deja fecundată.

Una dintre ciudăţeniile amintite constă în faptul că pentru fecundare ovulul este invadat de mai mulţi spermatozoizi, aşa încât nu se cunoaşte în prealabil care anume din nucleele masculine se poate împerechea, împreuna cu cel feminin.

Microinfecţia ADN în citoplasma celulei fecundate nu mai este suficientă pentru că acesta nu mai poate fi integrată în genomul viitorului embrion. Chiar dacă microinjecţia ar ţinti noul nucleu format, rezultatele ar fi suficient de îndoielnice pentru că la păsări, imediat după fecundare, cu o rapiditate surprinzătoare, nucleul este înconjurat cu o membrană foarte rezistentă înconjurată la fel de repede de o mare cantitate de albumină şi în final de o coajă uterină şi de una externă. Ca urmare, prin inducerea unei gene de interes s-a apelat la alte metode, şi anume:

1) Folosirea unor virusuri, mai exact retrovirusuri ca transportori ai unor gene-marker de origine bacteriană în stadiul de blastoderm al embrionului. Pe această cale, în cercetările efectuate la prepeliţe şi găini s-a putut obţine integrarea transgenei în nucleul oului. Dar, deşi la cele mai numeroase animale transgene obţinute pe această cale nu au fost produse virusuri, utilizarea în practică a metodei a fost blocată, considerându-se periculoasă pentru lanţul alimentar folosirea unui retrovirus în transferul unei gene pentru un produs atât de frecvent folosit în alimentaţie. Un detaliu care, firește, vorbeşte foarte mult despre grija pentru siguranţa alimentară umană a cercetării şi practicii biotehnologiei genetice. În consecinţă, s-a început cercetarea unor metode alternative.

Scanned with OKEN Scanner

2) Până în prezent la păsări nu au fost descoperite celule embrionare de bază astfel încât nici această direcție de lucru nu poate fi utilizată în obținerea păsărilor transgenice și s-a renunțat și la această pistă.
3) O a treia cale încercată care oferă anumite posibilități este aceea a LIPOFECȚIEI. Descriere:
   - Se extrage un embrion - sub formă de celule blastodermice.
   - Se pregătește o construcție ADN prin cuplarea electrostatică a ADN-ului de interes la un liposom (lipofecție).
   - Se transferă această construcție după depunerea ouălor direct în cavitatea subgerminală (fig. 232).
   - O parte din pui, după incubație vor rezulta în urma unui amestec de celule în care o parte dintre ele provin de la embrionul extras; cele mai multe provin însă de la un primitor (gazdă).
   - O astfel de creație (pasăre) este denumită **chimer.** În anumite chimere există celule care provin din celulele transferate, ele constituie o parte a liniei germinative și pot să producă celule germinative. Printr-o serie întreagă de împerecheri, specialiștii au reușit să obțină din aceste chimere, **linii transgenice** autentice.
   - Pentru creșterea probabilității formării chimerelor care dețin linia de germinație, se poate mări partea celulelor clonate și introduse în embrionul gazdă, urmând ca în cel mult o oră de la efectuarea transferului acesta să fie radiat cu o doză de energie de 5,4 → 6,6 Gray. Prin iradiere, o parte din celulele blastodermice sunt distruse. Prin aceasta se îmbunătățește raportul dintre celulele transferate și cele locale în chimer, în favoarea celor transferate, mărindu-se eficiența metodei. Cu toate acestea, eficiența procedeului este redusă, dar e singurul care ne conduce la păsări transgenice.

Alte metode, procedee alternative sunt acum în dezvoltare și nu ne îndoim că obținerea păsărilor modificate genetic va deveni în curând foarte productivă, eficientă.

5.4.1. Pentru ce avem nevoie de păsări transgenice?

Pentru îmbunătățirea raselor de păsări, utilizând următoarele direcții:
- Îmbunătățirea rezistenței la virusuri și coccidii, ultimile necesitând tratamente intense pe bază de antibiotice sau alte elemente care se introduc în furaje sau în apa de băut.
- Creșterea indicelui de conversie a furajelor în carne cu efecte economice deosebite.
- Creșterea calității cărnii de pasăre și reducerea cantității de grăsimi și colesterol din ouă.
- Folosirea păsării producătoare de ouă ca pe un bioreactor, care, urmare a unei inducții a unei gene specifice să producă în ou proteine specifice și în cantitate mare pentru uz farmaceutic. Această producție va fi localizată predominant în albuș.
  Această proteină, denumită și ovalbumină poate fi obținută prin codarea unei transgene speciale care va exprima formarea acesteia în ou, oul fiind înconjurat cu o coajă reprezintă un „depozit" din care ulterior poate fi izolată proteina indusă și atât de necesară. ■

Scanned with OKEN Scanner

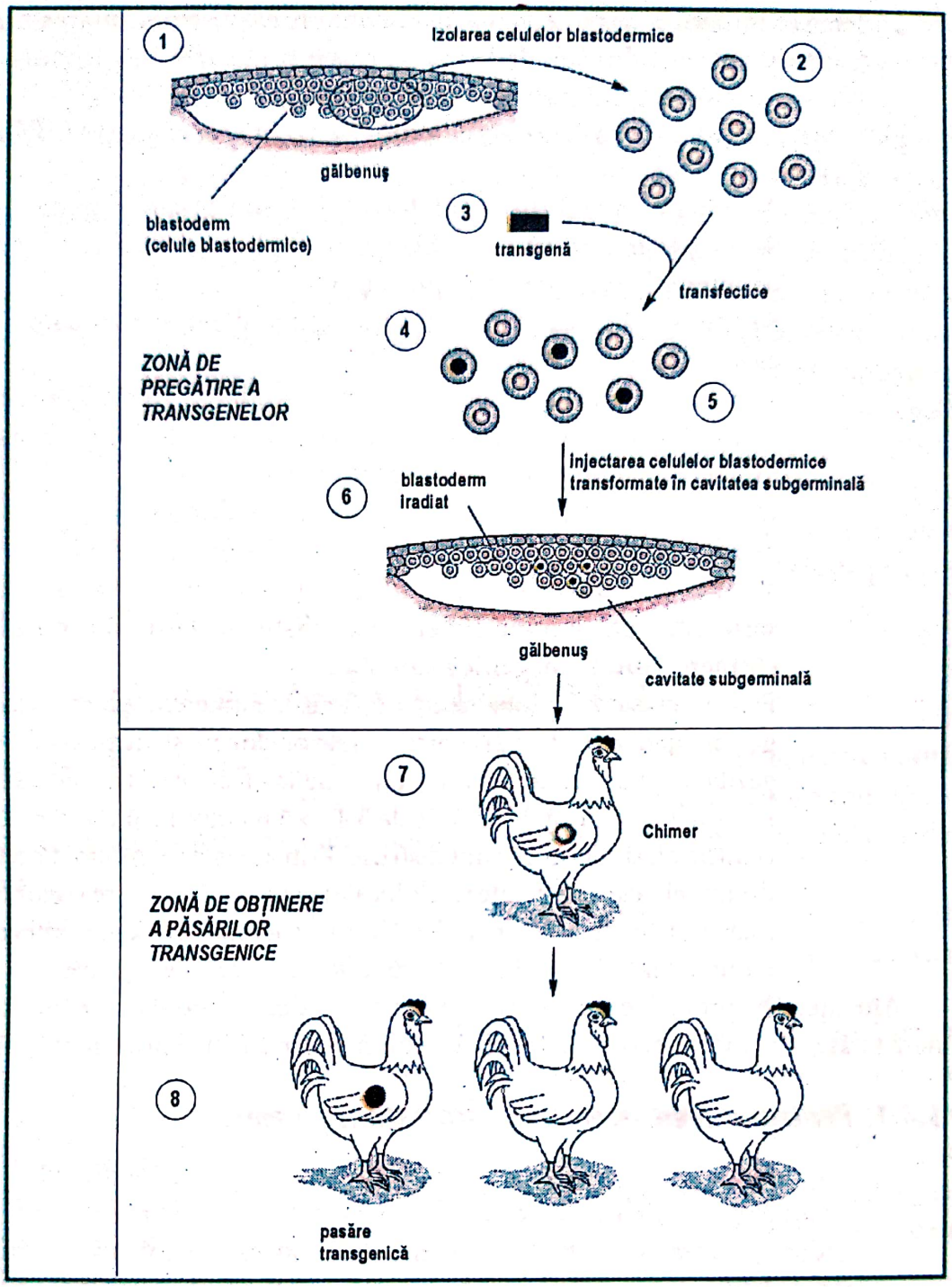


Fig. 232 – Transfecţia, procedeul cel mai potrivit pentru obţinerea păsărilor modificate genetic.
(1) - (2) - Se izolează celulele blastodermice din gălbenuş.
(3) Asupra acestora se aplică o genă prin procedeul de lipofecţie (liposom + ADN dorit).
(4) Se obţin parţial celulele modificate genetic (celule cu puncte de culoare închisă).
(5) Acestea sunt injectate în cavitatea subgerminală a gălbenuşului.
(6) La cca o oră blastodermul este iradiat pentru echilibrarea raportului dintre blastoderme şi blastodermele modificate.
(7) Prin incubare se obţin păsările denumite chimer care sunt numai parţial transgenice, ele deţinând o linie germinativă transgenică.
(8) Prin încrucişări şi selecţie se obţin chimere care deţin o linie completă de germinaţie modificată genetic (pasărea cu un punct închis la culoare): Aceste păsări constituie baza de plecare în obţinerea unei populaţii transgenice (*ilustraţie prelucrată după Bernard R. Glieck şi Jack Pasternak, 1997*)

Scanned with OKEN Scanner

5.5. OBȚINEREA PEȘTILOR TRANSGENICI

Pentru hrănirea omenirii, piscicultura capătă pe zi ce trece un rol din ce în ce mai mare. Peștele oferă o hrană ușoară, mult mai facil de digerat într-o lume îmbuibată de steack-uri de vită și rasoale de porc. Îmbunătățirea performanțelor în piscicultură prin tehnologiile genetice reprezintă o preocupare de mare actualitate a cercetătorilor din domeniu. În vizorul cercetării au intrat îmbunătățirea performanțelor la speciile: crap, somn, somon și bibanul pestriț din familia *Tilapia*.

Procedeul folosit pentru obținerea exemplarelor transgenice a fost acela al micro-injectării ADN-ului țintă în embrionii proaspăt obținuți prin fecundare. Procedeul a fost pus la punct în 1993 și este puțin modificat pentru că:

- La pești, nucleele după fecundare sunt foarte greu de recunoscut și de aceea injectarea construcției liniare a ADN-ului se face în citoplasma ouălor fecundate sau direct în embrionii în stadiul de 4 celule.
- Ouăle fecundate ale peștilor, spre deosebire de mamifere, se dezvoltă în afara corpului și deci nu este necesară nici o implantație în animalele purtătoare.
- Rata de supraviețuire a embrionilor la pești după macroinjectare este extrem de mare prin comparație cu alte animale și anume 30-80%, iar procentul tineretului transgenic oscilează între 10 și 70%.
- Constatarea existenței transgenei la pești se poate face prin analiza PCR (reacție în lanț a polimerazei) a ADN-ului eritrocitelor sau a celui prezent în solzi. ■

5.5.1. *Pentru ce este necesară transgenitatea?*

- În primul rând din motive economice: în acest sens s-au efectuat numeroase cercetări pentru obținerea unei gene care să codifice formarea unui hormon natural de creștere destinat accelerării vitezei de creștere.
- S-a efectuat în acest sens un studiu în care s-a realizat o construcție ADN din zona promotoare a proteinelor protectoare contra rezistenței la ger a speciei *Macrozoarees americanus* - o specie de pește din familia *Almutter*. Construcția ADN a constat din:
  - c-ADN-ul de interes pentru codificarea hormonului de creștere la somonul regal (*Oncorhynchus tschawaytscha*) la care s-au adăugat semnale terminale pentru poliadenilare pe poziția a 3′ - final a proteinei antiger de la *Macrozoarees americanus* .
  - Această construcție a fost injectată la ouăle speciei somonului atlantic.
  - Somonii transgenici obținuți au fost în medie cu mult mai mari și au crescut cu mult mai repede decât grupa martor. Sistemul de exprimare folosit aici a condus la transcripția hormonului de creștere într-un mediu format de apă rece, ceea ce a stimulat formarea unei noi forme de pește, care a permis în egală măsură obținerea unei ridicate performanțe economice dar și evitarea intoleranțelor genelor codificatoare ale hormonilor de creștere.
- În al doilea rând, transgenitatea este necesară pentru inducerea rezistenței peștilor la diferite boli (s-au depistat deja gene specifice pentru mai multe boli).
- În al treilea rând, sunt în curs de creație complexe ADN care să inducă peștilor o mai mare rezistență la factorii de mediu cu intenția deja declarată de a lărgi arealul de utilizare a speciilor valoroase.

Scanned with OKEN Scanner

– Menționăm că în marile crescătorii de somon din Canada și nordul SUA se folosesc pe scară foarte largă animale modificate genetic pe care le devorează cu mare plăcere atât americanii cât și europenii fără ca până în prezent să se fi înregistrat efecte secundare de vreun fel la consumatorii consacrați. ■

5.6. CÂTEVA CONCLUZII

1) Animalele de producție, utile omului, pot fi modificate genetic prin transferul unei gene străine, dar de interes, adică utilă pentru om, în genomul unei celule, creându-se apoi posibilitatea formării unei linii germinative, de o manieră în care organismul ajuns la maturitate poate fi utilizat la fabricarea liniilor transgenice.
2) Cercetările inițiale s-au concentrat pe șoareci. Pe aceste animale s-au elaborat majoritatea procedeelor de clonare a genelor și de introducere a ei prin microinjectare în ovulele fecundate.
3) Prin implantarea acestui ou-embrion în uterul unui animal purtător s-au putut obține animale tinere modificate genetic.
4) Transferul genelor de interes se poate realiza și prin folosirea ca vectori a unor retrovirusuri.
5) O altă alternativă oferă celulele de bază, de pornire, inclusiv cele de origine embrionară (EBC). Cercetările la șoareci au demonstrat că prin izolarea EBC și tratarea lor cu gene clonate se poate concepe o construcție genetică care apoi poate fi integrată în genomul celulelor embrionare de bază. Asemenea celule care conțin genele de interes pe locația deja prestabilită în genomul embrionar este selectată și injectată în tinerii embrioni la șoareci. Celulele embrionare de pornire la șoareci sunt totipotente, ceea ce presupune că pornind de la ele pot fi fabricate orice țesuturi, inclusiv țesuturile pentru linia de reproducție. S-au dezvotlat deja șoareci transgenici care servesc ca sisteme model pentru bolile umane cu transmitere ereditară precum Alzheimer, fibroza chistică, forme de cancer etc.
6) Pentru clonările somatice, celulele de bază sunt celule somatice de regulă recoltate din glandele uterului mamiferelor. În acest caz transferul nu se rezumă la o singură genă sau o construcție ADN ci la întregul nucleu. Ceea ce rezultă după implantarea în uterul unei prestatoare nu mai reprezintă nici linii de celule transgenice, nici organe ci un nou animal, organism care deține fondul genetic al donatorului.
7) Tehnici asemănătoare au condus la realizarea unor specii transgene la vite, oi, capre, porci, păsări și pește. Scopul acestor acțiuni este acela de a induce o dată cu genele sau cu diferitele construcții ADN performanțe superioare și sigure din punct de vedere al siguranței alimentare și al eficacității economice. Totodată, prin noile produse gentehnologice, prin transformarea animalelor în adevărate bioreactoare se urmărește obținerea unor substanțe (proteine) medicamentoase care pot revoluționa medicina și pot trata boli considerate de mult incurabile. Limitele acestor tehnologii ar trebui să existe și despre ele vom scrie într-un capitol viitor.

Scanned with OKEN Scanner

6. TEHNICILE GENETICE ÎN AJUTORUL VALORIFICĂRII SUPERIOARE A RESURSELOR NATURALE

Este foarte important de reamintit cititorilor noştri că la baza construcţiei vieţii în orice formă s-ar afla ea stau la bază patru elemente vitale şi anume:

- Azotul (N_3)
- Carbonul (C_4)
- Oxigenul (O_2)
- Hidrogenul (H_2)

Combinarea acestor patru elemente a dat naştere aminoacizilor de bază ai vieţii, aşa-numite cărămizi sau baze ale ADN-ului despre care am vorbit atât la începutul acestei cărţi.

Cele patru elemente constituente se găsesc în natură sub formă anorganică de unde, prin anumite procedee pe care le considerăm miraculoase, ele intră în componenţa elementelor de bază ale vieţii. Despre toate se poate vorbi în această carte însă pentru noi este foarte important să discutăm despre azot (N).

Azotul organic fie că este luat din plante, din îngrăşămintele fabricate în formă anorganică, fie direct din azotul natural care se găseşte în atmosferă sub formă de gaz inert într-un procent de 80% adică peste 80 t N_2/ha, el este cel care influenţează cel mai mult creşterea plantelor pentru că el constituie elementul fundamental al construcţiei proteinelor, al acizilor nucleici şi al altor molecule organice foarte importante. ■

6.1. FIXAREA AZOTULUI LIBER DE CĂTRE UNELE BACTERII DIN SOL

Această fixare este legată prin intermediul metabolismului unor bacterii care fac posibil ca azotul inert din atmosferă să devină disponibil plantelor. Inaccesibilitatea azotului atmosferic pentru plante este dată de faptul că acesta se află în aer şi sol sub formă de N_2 - inaccesibil plantelor. Este incredibil ca o plantă vie înconjurată de tone de azot, de care are atâta nevoie, să moară de foame pentru că nu-l poate folosi. Situaţia este identică cu a unui om însetat până la disperare care stă pe malul mării şi nu poate să consume o gură de apă pentru că aceasta nu-i este accesibilă metabolismului datorită conţinutului ridicat de săruri.

Pentru a putea fi folosit, azotul trebuie transformat în amoniu (NH_4^+) sau nitrat (NO_3^-). Spre deosebire de alte minerale, cei doi ioni radicali azotici nu pot apărea în sol prin degradarea mineralelor. Sursa principală a azotului mineral accesibil plantelor constă în:

- Degradarea humusului, materie heteropolicondensată cu ajutorul a numeroase bacterii cu formarea amoniacului, de către bacteriile amonificatoare. Cu această ocazie, prin procesul de oxidare a amoniacului o parte din azot redevine inert

Scanned with OKEN Scanner

și se pierde în atmosferă. Acest lucru este realizat de bacteriile de nitrificare prin fenomenul de reducere cu ioni de hidrogen.

$$2NO_3^- + 4H^+ - \uparrow N_2 + 4H_2O + O_2\uparrow$$

Pentru noi foarte importante sunt însă bacteriile fixatoare de azot atmosferic (N_2) pentru că ele aduc în sol o parte importantă din azotul inert N_2 pe care îl fac accesibil plantelor NH_3 (amoniac). Acest schimb de substanțe este denumit fixare de azot și este rezultatul a două procese importante:

a) Fixarea liberă a azotului în sol de către bacteriile libere simbiotice
b) Fixarea simbiotică a azotului prin intermediul simbiozei dintre unele bacterii și alge și anumite plante de cultură (fig. 235). ■

6.1.1. Fixarea liberă a azotului

Cercetătorii de „sinteză", cei care fac ca știința să devină „informație" științifică, consideră că întreaga viață pe pământ depinde de fixarea azotului, de fapt un schimb de substanțe de care dispun numai câteva procariote. Solul este gazda a numeroase bacterii care se numără printre procariotele fixatoare de azot. Transformarea azotului atmosferic (N_2) în amoniac (NH_3) este un procedeu extrem de complicat, care cuprinde numeroase etape, dar pe care noi îl simplificăm, prezentând numai partenerii de reacție și produsele finale (fig. 233).

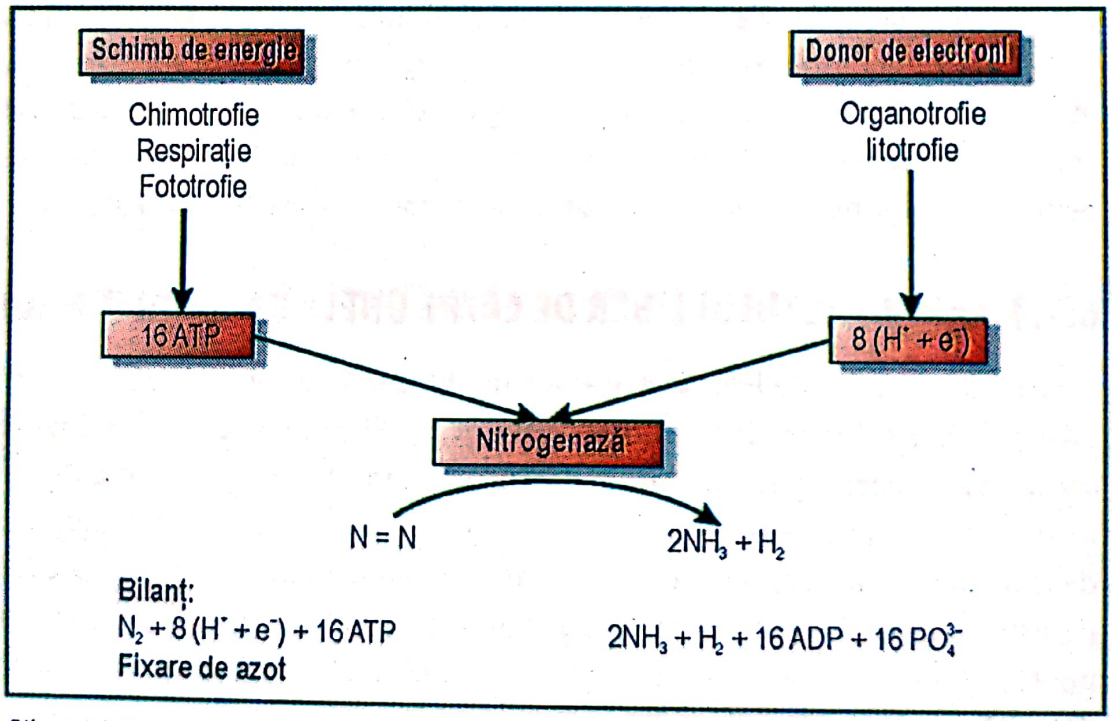


Fig. 233 – Bilanțul fixării azotului atmosferic de către diferite bacterii. Anual, pe suprafața pământului se fixează 200-300 mil t N_2 biologic, din care 1/3 se fixează în zonele marine și oceanice. Spre comparație, industria de îngrășăminte azotate produce numai 30 mil. tone /an. S-a evaluat de asemenea că fixarea simbiotică este cea mai eficace 50-150 kg N/ha/an în timp ce bacteriile libere fixează numai 1-3 kg azot/ha/an

O enzimă complexă denumită nitrogenază și care este foarte sensibilă la lipsa oxigenului catalizează întreaga reacție privind reducerea azotului prin intermediul

Scanned with OKEN Scanner

electronilor şi protonilor până la amoniac (NH_3). Bacteria foloseşte propria ei energie (ATP) şi anume opt molecule pentru fiecare sinteză a unei molecule de amoniac. O mare parte din această energie bacteriile o extrag din sol. Fixarea liberă a azotului se numeşte **diazotrofie**, iar organismele care au acest mod de viaţă sunt diazotrofice.

În soluţia solului, amoniacul preia încă un proton (N^+) transformându-se în amoniu (NH_4^+) pe care plantele îl pot absorbi cu uşurinţă. În principal însă plantele îşi procură azotul sub formă de nitrat (NO_3^-) care se formează în sol prin nitrificare (oxidare) de către o altă categorie de bacterii denumite nitrificatoare (fig. 233). După absorbţia nitratului de către rădăcini, el este redus din nou în amoniac de către enzimele plantei, ca apoi cu ajutorul altor enzime să fie transformat în aminoacizi, proteine şi alte legături organice. Cele mai multe plante îşi exportă azotul prin xilem din rădăcini către lăstari. Materialul transportat este alcătuit din nitraţi şi din diferite legături organice ce conţin azot. ■

6.1.2. Ce pot face biotehnologiile în acest domeniu

Azotul hrăneşte plantele care îl transformă în proteine, material extrem de preţios în hrănirea omenirii. Deocamdată, atât azotul obţinut prin sinteză chimică cât şi cel fixat în sol este extrem de energofag, costurile fiind greu de suportat, mai ales în ţările sărce.

Bacteriile libere, fixatoare de azot (*Agrobacter*, *Cyanobacter* etc.) folosesc la rândul lor mult prea multă energie pentru această fixare (opt molecule ATP). Părerea specialiştilor, inclusiv a celebrului Craig Venter este aceea că bacteriile folosesc mult prea multă energie, nu pentru a produce azot ci mai ales pentru a suporta costurile energetice ale adaptării bacteriilor la mediu.

Am observat din reacţia de mai sus că bacteriile produc simultan atât azot amoniacal (NH_3) cât şi hidrogen (material de mare valoare energetică).

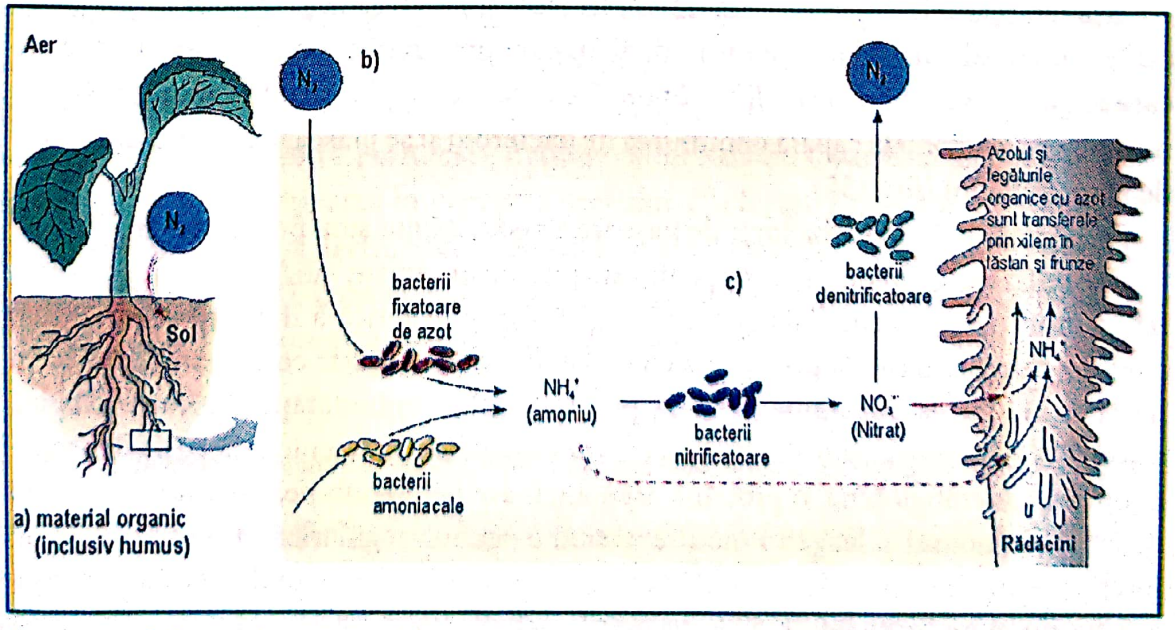


Fig. 234 – Rolul unor bacterii de sol în aprovizionarea cu azot a plantelor (*prelucrat după Neil Campbell şi colab., 2003 combinat cu informaţii diverse şi observaţii proprii*)

Scanned with OKEN Scanner

Azotul devine disponibil plantelor din două direcţii: (a) din sol, prin procesul de degradare a materiei organice şi transformarea legăturilor azotoase în amoniac de către bacteriile amonificatoare şi (b) prin fixare în sol de către bacterii de sol specifice. În amândouă cazurile se formează amoniac care (c) apoi sub influenţa bacteriilor nitrificatoare este transformat în nitrat (NO_3^-) care, pe de o parte este uşor prelucrat de plante iar (d) pe de altă parte este denitrificat de către alte bacterii şi pierdut în atmosferă sub formă de N_2. Amoniacul preluat de plante este transformat enzimatic în amoniac şi transformat în aminoacizi, proteine şi alte legături organice, după ce a făcut o călătorie prin lăstari şi frunze unde au avut loc complexe reacţii organice de unire cu produsele fotosintezei.

Ideea specialiştilor este asemănătoare proiectului Venter, şi anume constă în crearea unor bacterii fixatoare de azot care să fie profilate genetic pe acest domeniu şi să fixeze o cantitate mult mai mare de azot în sol. O altă idee este ca aceste noi organisme bacteriene modificate genetic prin transgene care exprimă fixarea azotului atmosferic să fie crescute în bioreactoare în care să producă amoniac liber, de natură atmosferică, ieftin şi nepoluant, care apoi să fie folosit, fie la fabricarea îngrăşămintelor cu azot, fie aplicat ca atare în soluţii apoase asupra solului şi plantelor. Asemenea cercetări sunt însă abia la început, dar ele promit foarte mult în următorii 15 ani. ■

6.1.3. Fixarea simbiotică a azotului

Numeroase plante, printre care în mod deosebit cele din familia leguminoase, au o caracteristică extrem de importantă, şi anume aceea de a-şi procura azotul necesar urmare a unei cooperări între plante şi anumite bacterii din genul *Rhizobiom*, specializate în fixarea azotului. *Rhizobium* aparţine subclasei α a protobacteriilor gram-pozitive, aerobe, fără spori, sub formă de coci şi bastonaşe.

Aşadar, plantele de cultură: mazărea, fasolea, soia, lucerna şi trifoiul formează în calitate de gazde pe rădăcinile lor nodozităţi care provin din modificarea unor celule care au primit vizita bacteriei *Rhizobium*. De îndată ce s-a localizat în celulele rădăcinii, bacteria rhizobială capătă denumirea de bacteroid şi se plasează în veziculi celulari de către rădăcini (fig. 235).

Detalii privind modul biologic de formare a nodozităţilor sunt prezentate în fig. 236.

Teoretic, dar şi practic, o nodozitate este un nou organism modificat genetic, rezultat în mod natural prin fuzionarea biologică dar şi genetică a două tipuri de celule complet diferite (o celulă procariotă cu una eucariotă). Această constatare interesantă ne aparţine iar ea constituie baza de plecare pentru îmbunătăţirea gentehnologică a fixării simbiotice a azotului. Citoplasma nodozităţilor are culoarea roşie deoarece conţine Leghemoglobină, o proteină asemănătoare hemoglobinei umane („Leg" vine de la leguminoase) şi leagă în mod reversibil oxigenul, regularizând respiraţia foarte intensă ce are loc în nodozităţi. Bacteria are nevoie de foarte mult oxigen pentru a produce o mare cantitate de ATP necesar fixării N_2 (vezi reacţia chimică – fig. 233). La rândul ei, nitrogenaza care transformă azotul în nitrat este foarte dependentă de oxigen, aşa cum am mai spus.

Scanned with OKEN Scanner

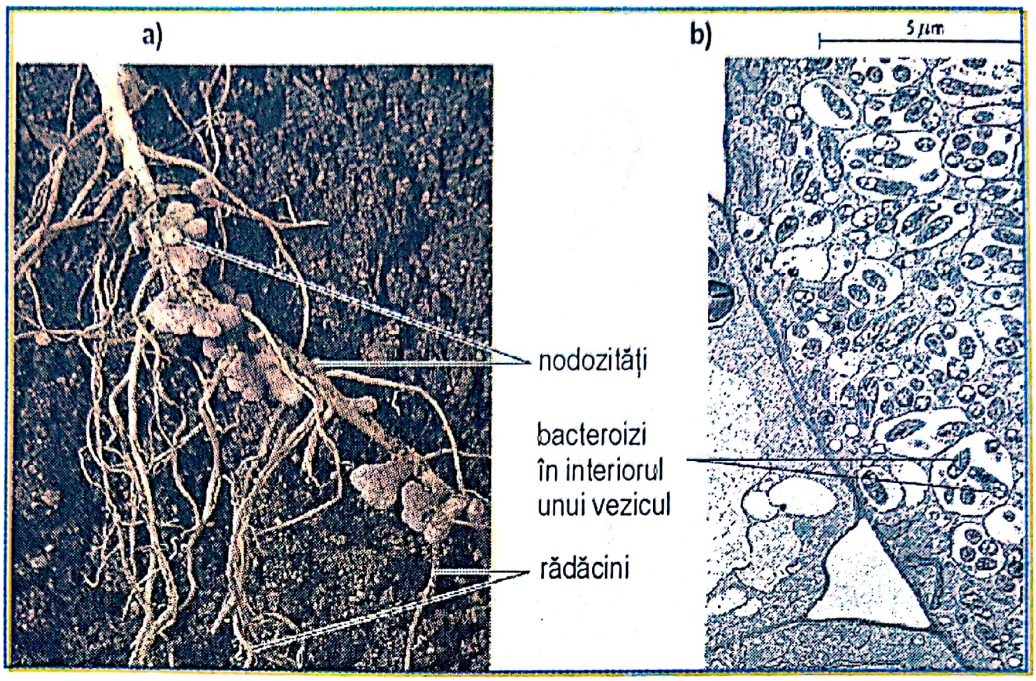


Fig. 235 – Formarea nodozităților la leguminoase
a) Rădăcina cu nodozități a unei plante de mazăre. Nodozitățile sunt reprezentate de îngroşările vizibile pe rădăcini şi care conțin rizobiile fixatoare de azot. Fixarea azotului este susținută energetic de produsele obținute prin fotosinteză.
b) Bacteroide în rădăcinile unei plante de soia. O celulă a nodozităților de pe rădăcini este înțesată cu veziculi care conțin bacteroide. Celula din stânga nu este infectată (TEM) - fotografie la microscopul electronic (*după Campbell şi colab., 2003*)

Fără a discuta rolul important pe care fixarea simbiotică îl are pentru agricultura de bune practici, subliniem şi rolul altor microorganisme în acest sens. Astfel, numeroase actinomicete fixează azot pentru diferite specii de Anin ca şi pentru numeroase ierburi tropicale. Orezul şi alte plante utile profită în mod indirect de azotul fixat, cultivatorii mai ales din China cultivând orezul cu o specie din familia Azolla, o ferigă denumită Farn, care deține o simbioză cu Cyanobacteriile familiei **Quinabaena**. Prin cultivarea împreună a orezului şi a ferigii Farn, într-un raport de neconcurență specifică, fertilitatea câmpului de orez a crescut în mod cu totul semnificativ. Orezul o dată crescut, înăbuşă feriga care dispare prin moarte, urmând ca prin degradarea ei biologică să se obțină cantități suplimentare de elemente nutritive. ■

6.1.3.1. Biologia moleculară a formării nodozităților la leguminoase. Îmbunătățiri biotehnologice

Dacă pornim de la ideea că nodozitățile reprezintă forme noi de viață, atât fenotipic pentru că ele nu seamănă nici cu planta gazdă şi nici cu bacteria, cât şi genotipic pentru că genomul celulelor nodozităților provine din genomul celulelor rădăcinilor + cel al bacteriei, atunci se pun o serie de întrebări de mare finețe ştiințifică la care trebuie obținute tot atâtea răspunsuri.

Scanned with OKEN Scanner

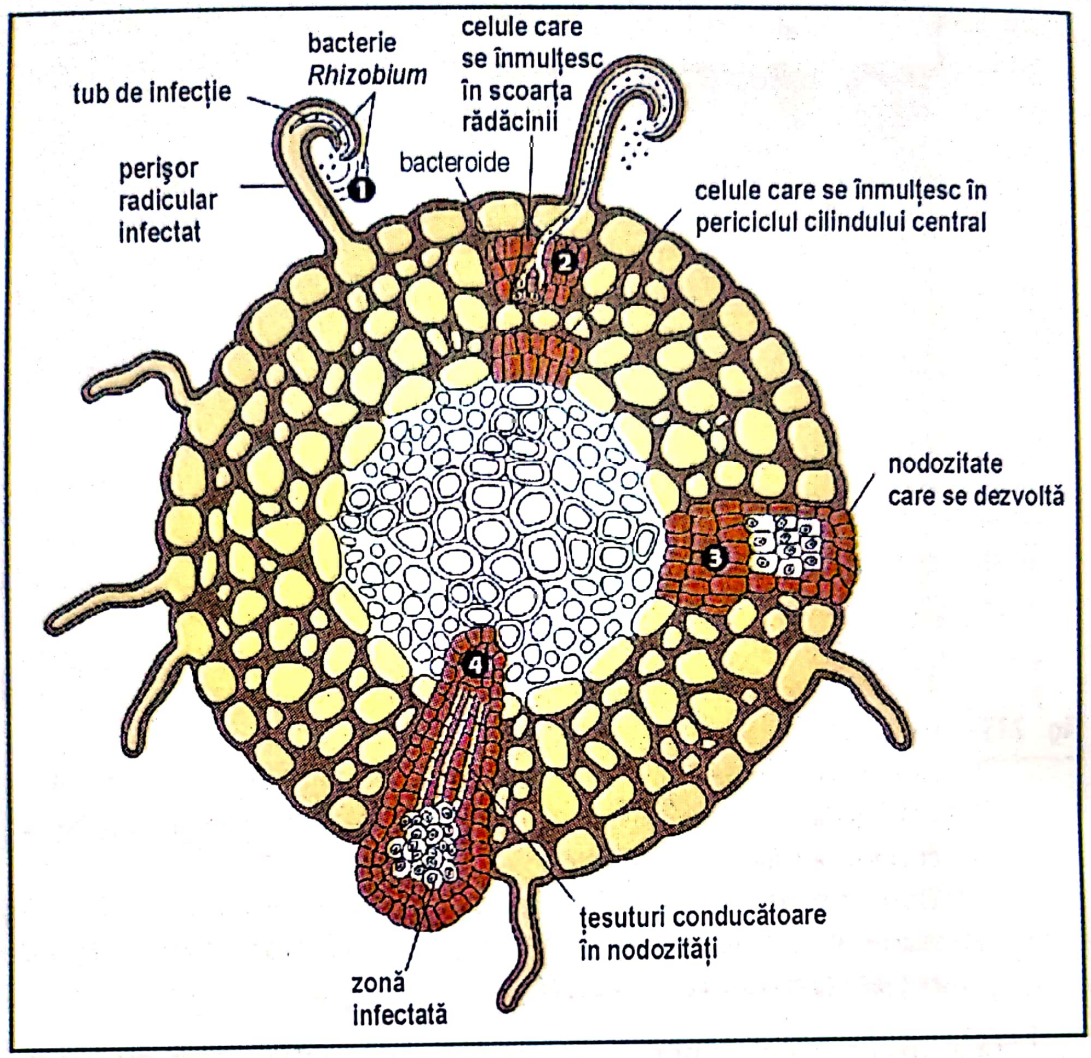


Fig. 236 – Infecția cu *Rhizobium* și dezvoltarea nodozităților la soia.

1. Rădăcinile secretă anumite semnale chimice pe care bacteriile Rhibozomium le recepționează. Bacteriile, la rândul lor, trimit semnale chimice până ce intersectează perișorii radiculari. Apoi, printr-o metamorfoză a membranei plasmatice se formează un tub de infecție.
2. Cu ajutorul tubului de infecție bacteriile pătrund în scoarța rădăcinii apoi în pericicluI cilindrului central unde încep să se înmulțească. Ajung apoi în vezicul unde, de asemenea se înmulțesc, după care tubul de infecție dispare.
3. Creșterea continuă în regiunile infectate ale scoarței și pericicluIui. În ambele zone celulele se înmulțesc, fuzionează și formează noduli.
4. Nodulii cresc în continuare. Se dezvoltă totodată țesuturi conducătoare care fac legătura cu xilemul și floemul plantei. Prin aceste conexiuni nodozitățile sunt aprovizionate cu hrană care stimulează formarea legăturilor azotice în nodozități. Noile legături organice cu azot prin intermediul cilindrului central sunt transferate în plante

1) Care este procedeul, cum reușesc să recunoască speciile de leguminoase din milioanele de bacterii existente în sol tocmai pe cele ale genului *Rhizobium* cu care trebuie să facă „afacerea"?
2) Cum are loc „întâlnirea" între rădăcini și speciile de *Rhizobium* pentru a realiza formarea și dezvoltarea nodozităților pe rădăcini?

Scanned with OKEN Scanner

Cercetând aceste două întrebări, cercetătorii au ajuns la concluzia că există un veritabil „dialog chimic" între bacterii şi rădăcini, fiecare partener primind şi răspunzând la semnalele chimice ale celuilalt. Acest dialog este coordonat de exprimarea unor gene specifice, acestea fiind responsabile de dirijarea procesului biologic şi biochimic al formării nodozităţilor (fig. 237).

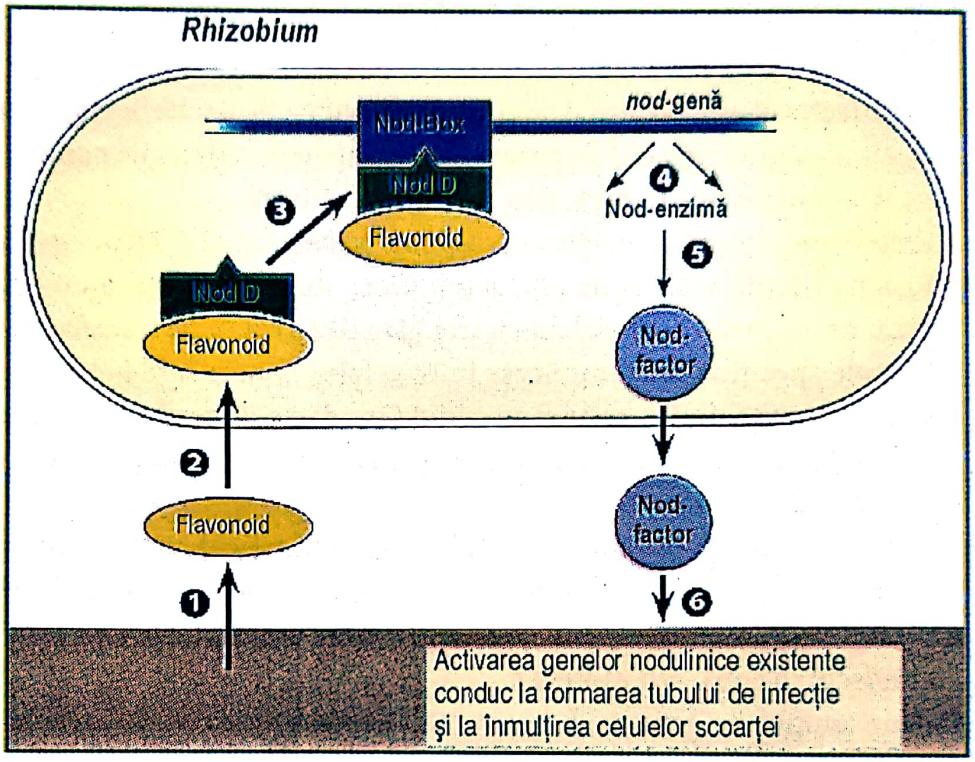


Fig. 237 - Biologia moleculară a formării nodozităţilor la leguminoase

1. Rădăcinile trimit un semnal în forma unei flavonoide specifice care este recunoscut numai de partenerul *Rhizobium*.
2. Flavonoidul activează o genă regulatorie în *Rhizobium* cunoscută ca Nod D.
3. Nod D, ca factor de transcripţie cuplează la o zonă ADN denumită Nod-Box şi se activează automat transcripţia genei-nod.
4. Produsele genei-nod sunt enzimele care realizează schimbul de substanţe pe anumite canale.
5. Căile schimbului de substanţe conduc la formarea unei legături asemănătoare chitinei denumită Factor-Nod.

Nod-factorul (factorul Nod) acţionează ca semnal specific între *Rhizobium* şi rădăcini şi declanşează în rădăcini infecţia prin crearea tubului de infecţie şi a formării nodozităţilor (vezi fig. 236)

Urmare a manifestărilor genelor implicate, procesul microbiologic se desfăşoară în următoarele etape:

- Plantele încep dialogul de îndată ce rădăcinile lor elimină în sol flavonoide.
- Flavonoidele sunt substanţe naturale extrem de diverse din care trei sunt mai cunoscute: Flavonoid 3'-o-metiltransferază, Flavonoid 3'- hidroxilază şi Flavonoid - oxidază (vezi anexa). Acestea pătrund în celulele bacteriilor care se află în apropierea rădăcinilor. Specificitatea semnalelor, depinde de structura flavonoidelor şi aceasta pentru că fiecare specie de leguminoasă elimină o flavonoidă specifică de *Rhizobium* specifică şi ea leguminoasei în cauză.

Scanned with OKEN Scanner

- Semnalul trimis de plantă determină crearea unei molecule de răspuns în bacterie. Mai exact, semnalul emis de plantă activează specific o proteină gen regulatorie, care, la rândul ei cuplează o grupă de gene bacteriene denumite nod-gene sau gene-nod (nod vine de la nodozități). Aceste gene codifică producerea unor enzime cu rolul de a cataliza formarea unor molecule specifice speciei și care au căpătat denumirea de Nod-factor (factor de nodulare - nodulation factor (ND).
- Nod-factorul este produs de populația specifică de bacterii, este eliminat în sol și acționează ca semnal de răspuns și, ca urmare rădăcinile acceptă infecția și sunt stimulate pentru formarea tubului de infecție.
- *Rhizobium* pătrunde prin tub și se dispune formarea nodozităților (vezi fig. 237).
- Reacția normală a plantei este acum aceea de a activa așa-numitele nodulații primare, probabil prin reglementarea genetică a căilor de transfer al semnalelor, metode specifice de comunicare între celule. Genele care produc nodozitățile sunt denumite **nodul-gene** și au codul (cnod), se găsesc în patrimoniul genetic al bacteriei, dar exprimarea lor în celulele nodozităților se face cu semnal transmis de plantă.
- Proteinele codate se numesc noduline și, în funcție de momentul apariției lor în sistem avem de-a face cu noduline timpurii, normale sau întârziate. Fiecare nodulină este codată de o proteină conform principiului de-acum foarte cunoscut, o genă = o proteină.
- Un exemplu de gene nodulinice **întârziate** sunt cele care codează și produc Leghemoglobina.
- Date noi care provin din cercetarea de specialitate sunt culese din cercetarea structurii moleculare a nod-factorului (NF), în vederea depistării modului în care aceste molecule bacteriene pot influența diverse gene din interiorul plantelor. Acest lucru ar deschide noi perspective pentru utilizarea rhizobiilor și la alte plante în afara leguminoaselor. Unul din rezultatele obținute, dar insuficient convingător, a fost acela că molecula Nod-factor se prezintă foarte asemănător cu chitina, produs care ocupă o mare parte a peretelui celular al ciupercilor chitinice și care se găsește și în exoscheletul artropodelor. În cazul moleculelor Nod-factori este vorba de o chitin-oligozaharidă cu o componentă lipidică, adică este vorba de o „Lipochito-oligozaharidă" care stă la baza structurilor chitinice (vezi anexa). Chitina este un polizaharid azotat, având în compoziția sa lanțuri de glicozid și resturi de glucozamină. Chitina stă la baza exoscheletelor nevertebratelor antropode, insecte și raci. Totodată, ea constituie componenta de bază a peretelui celular la alge, ciuperci și raci. Cu ajutorul unor enzime chitinhidrolizante cum ar fi, de exemplu chitinaza și chitobiaza, ea servește plantelor și animalelor pe scară largă.
- Pornind de la aceste detalii putem afirma că plantele sunt în măsură să formeze substanțe asemănătoare chitinelor, care, în mod sigur pot să acționeze ca regulatori de creștere.

Scanned with OKEN Scanner

- Pornind de la această descoperire s-a emis ipoteza că factorii-nod imită cu succes anumiți regulatori de creștere ai plantelor și, ca urmare rădăcinile sunt disponibile să accepte formarea unor noi organe care în acest caz sunt nodozitățile.
- Aprofundarea cercetărilor a condus la constatarea că **genele plantelor** care exprimă formarea nodozităților sunt implicate în numeroase alte procese și funcțiuni ale plantelor.
- Cercetătorii în biotehnologiile genetice sunt acum de acord că nu va trece multă vreme până când rhizobiile vor putea fi preluate și de alte plante neleguminoase putând să fixeze azotul pentru o multitudine de specii. Pentru aceasta, firește, gena care coordonează formarea nodozităților va trebui introdusă în culturile neleguminoase dar nu numai cu funcția de a produce aceste nodozități ci și cu celelalte funcții pe care le au plantele de cultură.
- Al doilea tărâm de acțiune al cercetărilor vizează mărirea cantității de azot fixat prin simbioză, în măsură să asigure un azot disponibil nu numai pentru cultura de bază (leguminoasă) ci și pentru alte culturi ce urmează într-un asolament de bune practici agricole.
- Oricum, conducerea procedurilor gentehnologice de fixare a azotului trebuie să se limiteze la necesarul strict al culturilor din asolament fără a se crea în sol un exces de azot pe această cale care ar putea fi dăunător prin procesul de nitrificare a amoniacului. Nitriții nu sunt buni în cantități excedentare, ei pot polua și crea dezechilibre ecologice periculoase. Cercetătorii vor alege, cu siguranță, calea de mijloc prin care se va produce tot atât azot cât este necesar pentru o dezvoltare optimă a ecosistemelor agricole și naturale.
- Bilanțul azotului în natură și masa organică vie va fi în permanență însoțit de celelalte trei elemente (oxigen, hidrogen, carbon) cu care alcătuiește principalele cărămizi, materii primordiale ale vieții.
- Dacă gândim că energia solară este captată în procent de 1% în materia organică a pământuui, ne putem imagina că s-ar putea pe calea biotehnologiilor genetice să se crească la 2% procentul de energie solară captată fotosintetic prin dublarea eficacității genelor care codifică fotosinteza. Este acest lucru bine sau nu? Este bine dacă fotosinteza mărită genetic este susținută de fixarea azotului, a carbonului și hidrogenului? Coordonarea trebuie să fie perfectă pentru ca procedul de dublare a materiei organice pe Terra să devină fapt real.
- A doua problemă ce rezultă de aici este modul cum este valorificată această cantitate imensă de materie organică care ar apărea pe pământ. Fabricarea ei ar trebui susținută de apă și elemente nutritive, or, amândouă sunt restrictive astăzi în lume. Iată de ce păstrarea echilibrelor este necesară pentru biotehnologii care, dacă vor să fie eficiente trebuie să respecte regulile de bază ale ecologiei. Nu trebuie obținută pe planetă mai multă materie organică decât pot să prelucreze sistemele antropice și naturale. Cine ar degrada o cantitate de materie organică atât de mare care ar depăși cu mult capacitatea de lucru

Scanned with OKEN Scanner

a microorganismelor descompunătoare? Repetăm, în tot ce facem pe pământ, inclusiv în domeniul celor mai performante tehnologii, omul trebuie să dea dovadă, atât ca cercetător, cât mai ales ca practician, de o mare cumpătare și echilibru.

– Lumea suferă un proces intens de poluare și degradare pentru cantitatea de biomasă care mai este. Totul este contaminat. Tehnicile genetice au pus la punct metode de decontaminare microbiologică a materiei organice destinată alimentelor sau altor scopuri. Aceste tehnici pot face obiectul unei alte lucrări pe care, poate, vom reuși a o scrie în următorii ani. ■

Scanned with OKEN Scanner

7. REGULI ŞI LEGI PRIVIND UTILIZAREA BIOTEHNOLOGIILOR GENETICE

7.1. INTRODUCERE

Energia atomică a apărut pe pământ aproape în secret, iar forţa ei a devenit publică o dată cu aruncarea celor două bombe atomice de la Hiroshima şi Nagasaki. Lumea s-a îngrozit atunci de forţa distrugătoare a atomului şi nimeni n-a mai crezut că această forţă poate fi pusă în slujba progresului tehnic uman, a obţinerii de energie ieftină şi mai puţin poluantă decât multe alte forme de energie.

Armele nucleare sunt prezente însă pe mari suprafeţe ale pământului şi riscul folosirii lor există pentru că nimeni nu are curajul să le distrugă. Se spune despre ele că sunt ţinute sub control. Energia existentă în moleculele vii şi mai ales viteza cu care se derulează relaţiile biochimice depăşeşte în dimensiuni forţa atomului. Noile biotehnologii ar putea fi cu mult mai periculoase dacă ar fi folosite ca arme decât energia nucleară. Amândouă, împreună, ar putea distruge în câteva ore în întregime viaţa pe planetă, transformând-o într-un pustiu pe termen lung.

Este bine însă să gândim tot timpul pozitiv şi să luăm în considerare numai realizările de excepţie obţinute de biologia moleculară în stabilizarea sănătăţii, în combaterea foamei şi în obţinerea unor surse de energie salvatoare pentru omenirea aflată în plină derută existenţială acum la începutul mileniului III.

Orice început în lansarea unor tehnologii de excepţie este foarte greu, mai ales atunci când se lucrează cu procedee care modifică însăşi viaţa, abătând-o de la regulile şi legile ei naturale. De aceea şi biotehnologiile genetice nu vor fi acceptate cu uşurinţă. Ele vor fi însă cu siguranţă promovate pentru că progresul uman nu poate fi oprit, iar aceste tehnici aduc foarte multe elemente de construcţie a unei lumi noi, poate mai bună şi mai curată.

Există astăzi în lumea ştiinţifică şi politică a planetei cele trei grupări prezente mai peste tot atunci când se decide soarta omenirii:

- **Grupul pozitivist**, acela care acceptă tehnologiile genetice cu condiţia ca să fie sigure. Unii dintre ei acceptă inclusiv clonarea omului, ceea ce este prea mult pentru omenire.
- **Grupul negativist**, care respinge total aceste tehnologii din motive politice, etice, morale, religioase. Europa, deşi îşi refuză tehnicile de transformare a celulelor, organelor şi organismelor, importă în scopuri terapeutice aceste produse. Uniunea Europeană nu pare dispusă să accepte organismele modificate genetic, deşi acestea sunt prezente în hrana consumatorului european. Date de ultimă oră demonstrează că în mod condiţionat UE a acceptat hrana obţinută din OMG-uri.
- **Grupul de mijloc** care propune utilizarea numai a unor tehnici genetice şi aceasta numai în scopuri terapeutice şi după o îndelungată verificare

Scanned with OKEN Scanner

a procedeelor aşa încât, linia dată de ei mi se pare extrem de interesantă şi anume: În conformitate cu legislaţia elaborată încă din 1979 şi 1975 în SUA, pentru orice tehnologie genetică înainte de lansarea ei pe piaţă, trebuie să fie bine cuantificate, măsurate, atât avantajele, şansele cât şi riscurile. Se acceptă acele tehnologii care aduc avantaje progresului omenirii, omului ca individ, sistemelor de dezvoltare economică şi socială şi se elimină riscurile, Dar oare sunt cunoscute **riscurile** în totalitatea detaliilor lor?

Teama cea mai mare a consumatorilor avizaţi ai lumii constă tocmai în faptul că organisme modificate genetic în scopuri productive exacte, cum ar fi bacteriile lui Venter sau retrovirusurile transportatoare de gene, să scape de sub control şi să creeze probleme ecologice catastrofale pentru omenire.

Cei mai buni cercetători ai lumii consideră că un asemenea pericol nu există decât dacă şi numai dacă aceste tehnologii încap pe mâna unor bioterorişti. Atunci da, există un pericol major, de aceeaşi natură ca şi în cazul energiei nucleare. Numai că o bombă atomică chiar şi creată artizanal este cu mult mai uşor de depistat de către instituţiile statelor care se ocupă cu siguranţa naţiunilor pământului decât, să zicem, 2 grame dintr-o aşa-numită toxină botulinică care poate fi fabricată într-un modest laborator şi care sunt suficiente pentru distrugerea întregii populaţii a Bucureştiului sau a oricărei alte metropole care conţine peste 2 milioane de locuitori.

Cele mai mari probleme de etică apar atunci când se pune problema manipulării genetice la om. Precizăm încă o dată că un om bolnav de cancer este unul modificat genetic, pentru că exprimarea genelor normale a fost înlocuită cu cea a unor gene modificate, fie de factori endogeni, fie exogeni. Cu toate acestea, crearea unui organism uman modificat genetic care să imprime rezistenţă la inducerea cancerului, a SIDA sau a altor boli incurabile creează mari subiecte de discuţie care cuprind mase, populaţii întinse de oameni aparţinând diverselor categorii sociale şi profesii, de la reprezentanţii religiilor până la portarii ministerelor. Aceasta poate şi pentru faptul că un organism uman modificat genetic constituie un preludiu pentru utilizarea acestor tehnici şi pe alte direcţii decât cele dorite, cum ar fi crearea unor oameni perfecţi, a unor supraoameni etc., ceea ce ar afecta grav echilibrele sociale. Este deci foarte greu pentru cercetători să răspundă numeroaselor întrebări legate de etica manipulărilor genetice legate de om, în afara celor destinate sănătăţii. ■

7.2. ISTORIA SE REPETĂ

La 15 septembrie 1941, Werner Heisenberg, pe vremea aceea cel mai tare cap în domeniul proiectelor naziste bazate pe uraniu, a făcut o călătorie la Copenhaga pentru a se întâlni cu mentorul său, marele fizician Niels Bohr, descoperitorul teoriei cuantelor. Călătoria avea loc în plin război mondial iar discuţia dintre cei doi cercetători, altădată buni prieteni, se desfăşura de data aceasta într-o ţară ocupată de naziști, interlocutorii fiind deci, acum, din tabere diferite; printre altele, danezul Bohr avea şi ceva descendenţe evreieşti. Nimeni nu a aflat ce au discutat cei doi pe perioada scurtei lor plimbări în aer liber, pentru a nu fi ascultaţi. De văzut au fost văzuţi de mulţi

Scanned with OKEN Scanner

agenţi. După reacţia de tristeţe a lui Bohr şi despărţirea lor intempestivă, s-au făcut multe speculaţii, s-au emis numeroase ipoteze privind această întâlnire. În fond, Heisenberg a dorit întâlnirea pentru a-şi clarifica, a-şi lămuri dubiile cu privire a dreptul moral al unui fizician precum şi obligaţia sa cetăţenească de a lucra la un proiect de construire a bombei atomice pe baza fisiunii nucleare. Totul a rămas însă un mister.

Astăzi, fiul fizicianului german, şi anume Martin Heisenberg, predă genetica creierului şi neurobiologia la Institutul pentru Biologie Celulară Theodor Boveri din Würzburg.

El încearcă să lămurească misterul întâlnirii tatălui său cu Bohr. El crede că tatăl său a dorit să discute cu savantul danez asupra unei decizii grele şi anume: „dacă bomba atomică trebuie efectiv construită şi nu dacă ea ar trebui construită în mod special pentru Hitler." Fizicienii ar fi putut, firește, să facă între ei o convenţie pentru a nu construi bomba. Se pare că Bohr a fost de-a dreptul şocat de o asemenea posibilitate.

Nici Heisemberg tatăl nu ar fi dorit construirea bombei de către naziști, cu tot patriotismul şi loialitatea sa faţă de ţară. Prietenia dintre fizicieni a fost decisivă, a fost mai presus de toate. Deasupra prieteniei dintre fizicieni, motivul principal al nerealizării bombei atomice la acel moment a constat însă în aspectele morale ale problemei, iar Heisenberg junior susţine că tatăl său a făcut toate eforturile pentru a împiedica, prin forţa argumentelor, construcţia bombei, atunci, în plin război.

Martin Heisenberg este astăzi un mare genetician. Este, de aceea, foarte importantă poziţia fiului faţă de o problemă similară contemporană, aceea a manipulării genetice, a reconstrucţiei omului folosind purificarea materialului genetic existent în „substanţa moştenirii". Savantul german oferă aici câteva detalii foarte interesante, şi anume:

- Problema utilizării celulelor primare embrioanre, deşi foarte importantă atât în practica terapiilor cât şi în tehnica reproducţiei umane, nu este cea mai importantă problemă a biologiei moleculare şi ea nu va conduce la crearea unei bombe genetice, biocelulare. Chestiunea este mult mai complexă. Dacă se acceptă ideea că omul nu este altceva decât un produs al evoluţiei şi că biologia poate clarifica toate probemele lumii, atunci ea se înţelege greşit iar evoluţia merge spre o înfundătură. Tot răul umanităţii este considerat a fi datorat astăzi biologicului: sexul, criminalitatea, bolile, pregătirea şcolară precară, totul. Biologia răspunde biologicului, dar nu se suprapune peste noţiunea de „viaţă umană". Viaţa umană este biologie plus încă ceva care se găseşte în minţile cercetătorilor. Biologia nu răspunde întrebării dacă avem voie să experimentăm cu celule embrionare sau nu. Un asemenea răspuns vine din creierele cercetătorilor, politicienilor şi alte altor factori de decizie şi nu apare numai ca urmare a unui simplu metabolism biologic, întâlnit la orice vietate. Înţelegerea eronată a darwinismului s-a soldat cu nebunia raselor, prin care s-a făcut mult rău omenirii. Se speră ca această greşeală că nu reapară în planul biotehnologiilor.

Scanned with OKEN Scanner

- Problema experimentării cu celule primare este cantonată, deocamdată, la nivelul animalelor (afirmație inexactă, așa cum am văzut, n.a.), trecerea la om fiind dictată numai de rațiuni terapeutice. Așadar, spune Martin Heisenberg, preocuparea față de „bomba genetică" este acum **exagerată**.

Biologia ne-a ajutat să înțelegem multe, dar ea nu ne poate explica totul. Este, desigur, folositor a se experimenta, căci chiar și atunci când se greșește se învață ceva, un experiment este binevenit. Lumea întreagă, la scara ei planetară nu trebuie să devină un câmp al experimentării deoarece nu ne este permis să spunem: „VOM VEDEA CE SE VA ÎNTÂMPLA CU ACEASTĂ LUME".

În realitate, lucrurile, din păcate, nu stau așa cum le vede savantul din Würzburg. Nu este permis, de exemplu, a se experimenta medicamente noi pe oameni. Cu toate acestea, foarte numeroase întreprinderi, gen Life Sciences, fac numeroase experimente în ziua de azi pe oameni, fără ca acest lucru să fie făcut public, departe de ochii presei, din rațiuni exclusiv economice, speculative, investind mulți bani în cercetare. Uneori, când interesele sunt mari, chiar și institutele de cercetări sunt stimulate să înființeze firme care să valorifice produsele cercetării. Un bun comerciant nu va apărea niciodată dintr-un om de știință pasionat de meserie. Și dacă totuși va apărea, cei care doresc să câștige mulți bani din aceasta sunt definitiv pierduți pentru știință.

- Bombele atomice și nucleare sunt peste tot în lume și reprezintă un pericol pentru omenire. Ele sunt rezultatul cunoașterii și exploatării atomului nebiologic.
- Bombele biologice sunt și ele prezente și reprezintă un pericol la fel de mare pentru omenire, fie că sunt bacteriologice, virusologice sau toxicologice. Ele reprezintă efectul cunoașterii organismelor biologice, a esenței biologiei, a forței distructive a celulei vii sau a unor segmente din ea.

În amândouă cazurile există și exploatații civile ale tehnologiilor în cauză, de mare importanță economică pentru omenire.

Bomba genetică va veni și ea cândva. Depinde de decizia societății umane în ce fel va fi folosită această tehnologie care se bazează pe însușirile genelor ce alcătuiesc genomul.

Oricum, prea multe tipuri de „bombe" s-au acumulat pe pământ și nu este deloc exclus ca erori umane sau acte teroriste să deturneze sensul pozitiv al acestor tehnologii spre cel negativ, distrugător pentru civilizația umană. ■

Scanned with OKEN Scanner

8. ALERGĂTURA DUPĂ CLONARE ŞI DUPĂ CLONE

Din multitudinea de tehnici şi procedee genetice destinate atât îmbunătăţirii performanţelor economice şi sociale cât mai ales a optimizării folosirii resurselor naturale şi a conservării şi măririi diversităţii plantei, un număr relativ mic de potentaţi ai vremurilor de pe mapamond şi-au ales clonarea la oameni şi animale ca principalele preocupări biotehnologice pe care doresc să le finanţeze. Este vorba de oamenii cu mulţi bani şi cu mai puţină responsabilitate dar care, tocmai din cauza lipsei lor de erudism ar dori să-şi prelungească viaţa pe pământ tocmai prin clonare. Aceasta poate şi pentru faptul că o clonă, deşi este o copie a organismului clonat, ea conţine şi o anumită cantitate de material genetic de la donatorul celulei reproductive şi că copia nu va fi niciodată 100% identică cu originalul. ■

8.1. CLONAREA LA OAMENI

În această carte am prezentat în detaliu numeroase studii asupra folosirii clonelor în tratarea diferitelor maladii, unele din ele foarte grave. Evoluţia biotehnologiilor a devenit însă atât de rapidă încât recent, mai multe clinici de specialişti au anunţat o iminentă apariţie a copiilor şi deci a oamenilor obţinuţi prin clonare.

După numeroase teste efectuate pe şoareci, oi, porci, vite etc., cercetătorii şi-au propus aplicarea tehnicii de clonare la oameni şi, dacă vă întrebaţi dacă oamenii vor să se lase clonaţi, atunci aflaţi că la primul sondaj 5% din naţiunea germană doreşte cu ardoare acest lucru, iar 1,6% dintre ei consideră că acest fenomen ar fi normal şi foarte etic.

Fig. 238 – Aşa arată copiii clonaţi (*după revista Focus*)

Scanned with OKEN Scanner

Sub titlul „Un păcat de moarte, obiect al cercetării", revista germană „Focus" publică o serie de materiale pe această fantastică temă. Pe de altă parte, Internetul este ocupat cu peste 1000 de pagini pe aceeaşi temă. Cu unii din autorii publicaţiilor avem relaţii personale, care ne-au ajutat să clarificăm direct aspecte ştiinţifice ale acestui material.

În esenţă, importanţa economică a clonării pornind de la indivizi adulţi este canalizată pe patru direcţii importante şi anume:

a) Clonarea la plante, pentru obţinerea unor indivizi liberi de boli, foarte productivi şi cu utilizare specială.
b) Clonarea la animale, pentru reproducerea unor caracteristici de producţie şi calitate deosebite precum şi pentru obţinerea unor indivizi şi populaţii rezistente la boli sau pentru promovarea lor ca bioreactori naturali.
c) Clonarea la om cu două subdirecţii:
   c1) Clonarea în scop medicinal (clonare terapeutică) prin obţinerea unor embrioni (de tratament) până la vârsta de 2 săptămâni (Anglia, SUA) sau o săptămână (Franţa). În multe ţări procedeul încă nu este permis.
   c2) Clonarea adulţilor, în scopul refacerii unor copii umane fidele, probabil a unor indivizi foarte performanţi, măsură foarte contestată, dar care se pare că nu poate fi evitată de către societatea umană.

În această parte a cărţii nu vom comenta măsurile a) şi b) prezentate în detaliu în capitolele anterioare şi acceptate de marea majoritate a societăţii umane conştientă de valoarea acestor tehnologii. ■

8.1.2. Puţină istorie

În 1875, pentru prima dată, biologul **Oskar Hertwig** descrie **contopirea celulelor primare ovul + spermatozoid la specia de arici de mare** (*Echinoidea*) cu formarea unei noi celule embrion. Prin aceasta, **Hertwig este considerat pionierul embriologiei**, la sfârşitul secolului XIX.

În 1878, austriacul **Samuel Shenk fecundează ouăle delfinului brun pe mucoasa uterină.**

În 1885 biologul **Weismann descoperă că, în cazul unei celule normale, în caz de segmentare, informaţia genetică se reduce. Dimpotrivă, teza sa susţine că celula ou conţine toate informaţiile genetice, inclusiv după diviziune.**

În 1944, germanul **Hans Spemann propune, primul, înlocuirea într-o celulă ou, a unui nucleu cu un altul** şi primeşte pentru aceasta Premiul Nobel. În acelaşi an, americanii **John Rock şi Miriam F. Menkin fecundează in vitro celule primare umane.**

În 1952, cercetătorii americani **Robert Briggs şi Thomas J. King clonează pentru prima dată un animal.** Ei **înmulţesc broaşte pornind de la celulele mormolocilor.** Prin aceasta, ei confirmă teoria lui Spemann, mort între timp, dar necunoscut celor doi cercetători americani.

În 1959, dintr-un laborator american a apărut pe lume **un iepure creat într-un vas de reacţie. Este vorba de primul mamifer apărut pe această cale**, încă nede-

Scanned with OKEN Scanner

finită până în acest moment. Biologul britanic **Jonathan B.S. Haldane** se folosește de această creație pentru ca, în **1963**, să introducă **noțiunea de „clone".** Inițial, el consideră că procedeul de clonare a animalelor nu trebuie utilizat.

În **1973,** renumitul biotehnician **John Gurdon** de la Universitatea din Cambridge **introduce nuclee celulare extrase din pielea broaștelor adulte în celule ou din care a fost extras nucleul.** Deși au rezultat animale, acestea au murit în faza de mormoloci. Cu toate acestea, **experimentul a demonstrat că este posibilă clonarea, folosind celule recoltate de la animale adulte.**

În **1978, pe 25 iulie, se naște prin cezariană copilul Louise Brown, în Anglia. Este primul copil fecundat în vasul de reacție și apoi implantat în uterul mamei.** Biologii **Edward și Steptoe** anunță prin această realizare o nouă eră în biologia reproducției umane. Louise Brown a fost denumit „copilul secolului". Astăzi trăiesc pe pământ 500.000 de copii și tineri născuți prin această tehnologie.

În **1994** cercetătorul american **Neal First** creează în laborator patru viței obținuți prin clonare dintr-un embrion congelat. În **1996,** biologii **Keith Campbell** și **Ian Wilmut** au dat naștere prin clonare cunoscutei „Dolly", primul mamifer obținut prin clonarea celulelor adulte (procedeul este în detaliu prezentat în capitolul 6).

În **1998**, unei grupe de cercetători îi reușește în Hawai **clonarea a trei generații de șoareci** - în total au obținut 50 de animale. În același an, **cercetătorii japonezi clonează 8 viței identici, obținuți numai din celule adulte.**

Tot în **1998,** o echipă de **cercetători sud-coreeni** anunță **clonarea unui embrion uman,** cercetarea fiind întreruptă la timp pentru a nu evolua fătul.

În **2000**, o altă echipă de cercetători de la College Veterinary Medicine A & N University **obțin prin clonare un taur rezistent la trei boli importante,** foarte periculoase. La vârsta de 1 lună, vițelul în cauză purta numele de „86 Squared" (fig. 239).

Efectul economic al acestei realizări este fantastic.

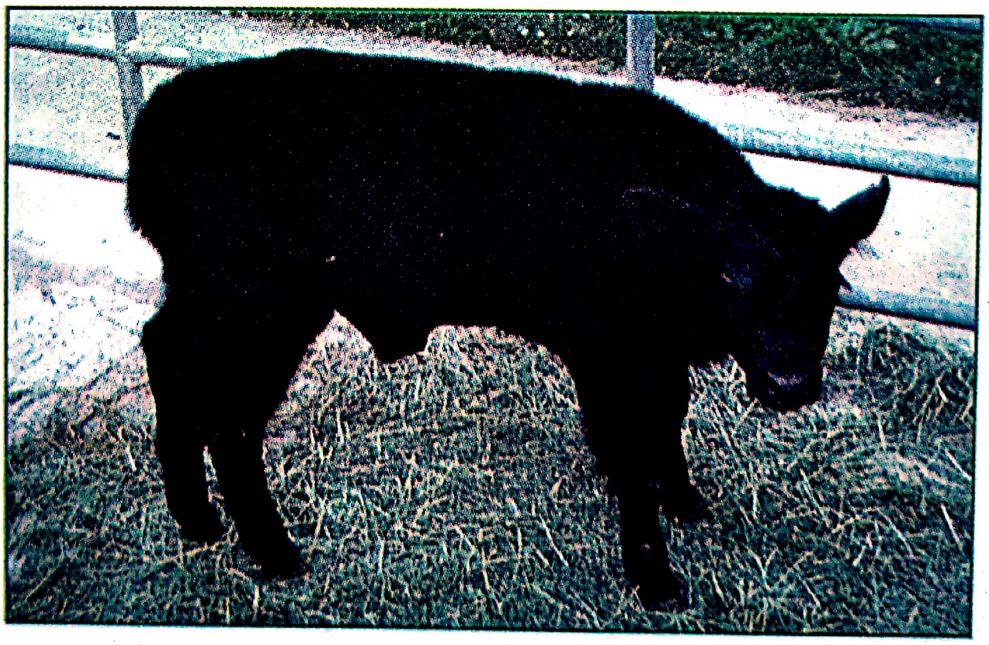


Fig. 239 – Un vițel clonat, rezistent la boli (*Focus, 2003*)

Scanned with OKEN Scanner

În 2000, guvernul britanic omologhează utilizarea „clonelor terapeutice" sub formă de embrioni umani pentru scopuri de cercetare şi tratament. În acelaşi timp, politicienii germani, ca şi reprezentanţii bisericii, se opun acestor cercetări.

Dimpotrivă, cercetătorul american Richard Seed construieşte o clinică pentru clonarea de bază a oamenilor.

Aşa cum s-a observat mai sus, cercetătorii lumii s-au învârtit în cercuri concentrice din ce în ce mai apropiate omului până la momentul anului 2000 când cercetările au atacat direct specia umană. Se va vedea, în continuare, că procesul de clonare umană s-a realizat deja cu mulţi ani înaintea sfârşitului de secol şi mileniu, însă cercetările au trebuit să fie distruse din cauza opoziţiei publice şi politice şi, îndeosebi a bisericii. Anul 2000 a adus două mari evenimente ştiinţifice în America şi Anglia, evenimente care aparţin biologiei moleculare şi care se susţin unul pe altul.

1) Bill Clinton şi Tony Blair au anunţat descifrarea genomului uman în iunie 2000, descifrare care nu era încă completă şi care înzestra specia umană cu cca 130.000 gene. Unul din actorii principali ai acestei descoperiri milenare era Craig Venter, care promisese în iunie 2000 că va reveni cu descrierea exactă a celebrului genom uman. Şi, într-adevăr, la sfârşitul lui ianuarie 2001 el revine şi anunţă că genomul uman este alcătuit din mult mai puţine gene, numărul acestora situându-se între 26.000 şi 50.000, ca în final să fie inventariate 42.000. Asta înseamnă că cele două team-uri care lucrează în concurenţă la acest caz mai au încă de lucru. Se constată însă un aspect surprinzător, şi anume că un număr de gene ale omului este aproape identic cu al unui câine şi nu foarte departe de al unei râme. Diferenţa dintre om şi şoarece este de numai 300 de gene. Diferenţa mare între datele publicate în 1999 şi cele publicate la început de februarie 2001, ar fi dată în explicaţia lui Venter, de numărul mare de gene identice găsite pe cromozomi diferiţi. *„Noi, oamenii, construim un sistem special în care funcţionarea secvenţei genetice este complet diferită faţă de a câinelui meu „Shadow" care n-a scris nici o carte şi n-a făcut nici o cercetare, deşi are aceeaşi moştenire genetică din punct de vedere cantitativ ca şi a mea."*

Cercetări, de asemenea recente, au demonstrat o asemănare fantastică între genomul uman şi cel al porcului, care a permis deja folosirea acestui animal pentru fabricare de sânge transfuzabil în organe transplantabile.

Noua comunciare a lui Venter, pe care o considerăm fantastică, dă un nou impuls, şi unul foarte mare, teoriei evoluţioniste a lui Darwin. Se demonstrează acum, foarte uşor, că omul este rudă cu toată lumea vie şi că este deci un produs calitativ al acesteia. În această situaţie, Venter este obligat să afirme că: „În condiţiile în care diferenţa de număr de gene între om şi râmă este de numai 13.000, numărul de gene în sine nu spune prea mult despre complexitatea unei fiinţe vii. Cei mai mulţi oameni cred că noi avem câte o genă pentru fiecare particularitate, însuşire, etc. şi că aceste însuşiri ar putea fi reproduse prin clonare". Este absurd, spune el. *„Clonarea nu va putea niciodată reproduce identic aceeaşi persoană. Luaţi exemplul a doi gemeni. Deşi ei seamănă bine, sunt personalităţi bine distincte. Niciodată Hitleri sau alţi monştri nu vor putea fi clonaţi"*, spune Venter.

Scanned with OKEN Scanner

Noi, oamenii, suntem genom + mediu, iar când vorbim de genom, trebuie să spunem că el este alcătuit din cca 250.000 proteine şi acestea deosebesc calitativ omul de mamifere. Modul de construcţie şi sinteza acestor proteine se va putea realiza numai după construcţia unor supercomputere care abia acum se proiectează împreună cu guvernul american şi cu firma Compaq.

Câtă dreptate are Venter se va putea verifica nu peste multă vreme. Până atunci, putem accepta că Darwin a avut foarte multă dreptate când afirma că „toate fiinţele vii sunt înrudite" deşi nu cunoştea nici o genă, sau „apariţia speciilor este piatra de temelie a ştiinţei evoluţiei".

A doua mare realizare pe care am prezentat-o în detaliu în această carte a fost acordul dat de guvernul britanic pentru utilizarea clonelor ca „material terapeutic". Acest lucru a uimit restul Europei, obligându-i pe germani, care au cel puţin 3 institute de cercetări genetice foarte importante, să importe clone terapeutice de la englezi şi, în curând, poate şi de la francezi. ***„Metoda poate fi o mare speranţă pentru cei foarte bolnavi, dar o noţiune neacceptabilă, periculoasă pentru politicieni şi biserică".***

Ministrul sănătăţii din Germania afirma: „Viaţa umană nu trebuie să fie folosită ca material de cercetare" în timp ce dl Schröder afirma, la rândul său: „Germania nu va efectua cercetări cu celule embrionare până în momentul în care cercetările efectuate cu asemenea celule va fi sigur că nu vor duce la reproducerea omului."

Poate că politicienii germani au dreptate, dar cine-i opreşte pe alţi cercetători din lume să o facă? Firește, nimeni.

Între timp, lucrurile s-au schimbat mult. În acest moment şi cercetătorii germani au primit dreptul de a efectua cercetări cu celule embrionare.

Pe de altă parte, cele două mari realizări prezentate mai sus se completează. Cunoştinţele complete asupra genelor şi, mai ales a proteinelor (secvenţe de gene) fac foarte posibil un lucru extrem de important. În celula clonă, adică în celula golită de informaţie, se poate introduce conţinutul unei celule adulte pentru a reproduce un individ, dar fără îndoială că se pot introduce şi secvenţe ale genelor care să îmbunătăţească sau să schimbe fundamental însuşirile noului individ clonat. Or, viziunea lui Venter tocmai aici se opreşte. Fără să vrea, el pune la dispoziţia lumii ştiinţifice informaţii genetice extrem de utile, inclusiv celor care, prin clonarea umană încearcă manipularea speciei. Aici este punctul critic al problemei care implică morală, etică, dar mai ales siguranţa speciei şi a planetei. ■

8.1.3. Noi evoluţii spre clonarea reproductivă

Umanitatea îşi pune mari speranţe în discernământul cercetătorilor. Este clar însă pentru toată lumea avizată că acum lucrurile sunt scăpate deja de sub control. Naivii îşi închipuie acum că cercetătorii au împărţit clonele foarte curat în două categorii şi anume: clone „bune", adică cele terapeutice şi clone „rele", adică cele reproductive. Lucrurile par într-adevăr să fie aşa, dar nu sunt deloc. Noi evoluţii indică apropierea de o clonare umană autentică.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă în clonele terapeutice s-au utilizat procedeele Dolly sau Honolulu, Florian Rötzer publică în 14.01.2000 un material privind un nou procedeu de clonare la maimuțe.

Cercetătorii Centrului de Cercetare al Primatelor din Oregon au realizat acest lucru în toamna anului 1999. Ei au procedat la divizarea celulelor embrionului unui cimpanzeu, urmând a produce 4 maimuțe genetic identice. Deși procedeul s-a încercat și la alte animale, el a reușit numai la maimuțe. Aceiași cercetători au produs pentru prima data așa-numite transgene ale maimuțelor. Utilizând în experiment un embrion format din 8 celule la o specie de maimuțe mai mici, folosind metoda „subdivizării ei", ei au obținut „subembrioni" în mărime de 2, 3 sau 4 celule. 13 din acești „embrioni parțiali" au fost implantați unor maimuțe purtătoare. 4 dintre aceste maimuțe au rămas gestante, însă numai un făt viu a supraviețuit și s-a născut în 4 septembrie 1999. Numele maimuței este Tetra (fig. 240).

Metoda a demonstrat cât de flexibil și fiabil este embrionul clonat și ce posibilități imense oferă, de acceptare a informației și apoi de divizare a ei în organisme identice. Firește că cercetările, ca și clonarea (și se pare că, în anul 2000 au mai apărut alte 4 clone) au fost efectuate în scopuri terapeutice.

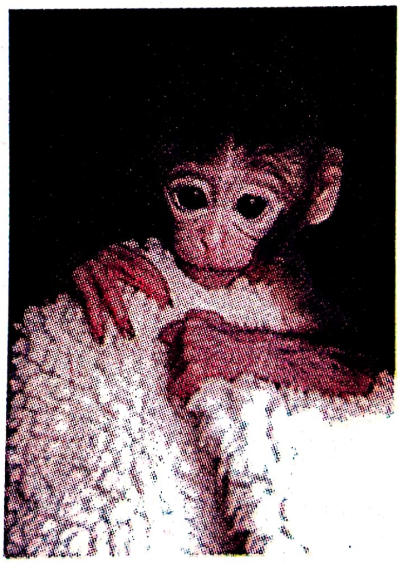


Fig. 240 – Maimuțica clonată Tetra

Procedeul permite obținerea unui număr foarte mare de maimuțe identice din punct de vedere genetic, ceea ce pune la dispoziția cercetătorilor suficient material pentru testele de combatere SIDA și a altor imuno-sisteme. Același autor susține însă în finalul prezentării sale că: „Dacă această metodă aplicabilă acum maimuțelor se perfecționează foarte puțin, atunci poate fi aplicabilă și oamenilor. Embrionii umani pot fi subdivizați și, firește, pot fi obținuți gemeni, 3 sau 4 copii identice genetic. Aceasta s-ar numi o producție de „clone umane" care nu este interzisă în SUA. Așadar, în timp ce procedeul Dolly dă naștere la un singur duplicat, subdivizarea embrionului de la o singură familie dă naștere la 4 indivizi identici care, apoi, dacă se dorește, se pot înmulți în proporție geometrică." Productivitatea redusă a clonelor la unele animale a fost explicată în detaliu în această lucrare. ■

Scanned with OKEN Scanner

8.1.4. Încet, dar sigur spre clonarea reproductivă a speciei umane

„Dr. Frankenstein" a fost puternic biciuit în 1993 când a reuşit prima clonare a unui embrion uman. În locul unei recunoaşteri internaţionale, aşa cum ar fi fost normal, el a recoltat mânia numeroşilor colegi copământeni, fiind obligat a-şi distruge experimentul. În numai 8 ani, scandalul primei clone umane a fost uitat sau, dimpotrivă, putem spune că toţi specialiştii în materie gândesc numai acest lucru.

În decembrie 1998 un grup de cercetători de la Universitatea Kyung Hee din Seul, Coreea de Sud, anunţă că au reuşit izolarea nucleului unui ovul nefecundat, pe care l-au transferat apoi în carapacea altei celule. S-a reuşit deci o clonă cu celulă primitoare adultă. Atât celula ou cât şi cea corporală provin de la o donatoare de 30 de ani. În total, echipa coreeană a utilizat 6 ovule de la 2 femei. Dr. Lee Bo Yon, şeful echipei de cercetare a confirmat însă că experimentul a fost întrerupt în momentul în care embrionul a ajuns în faza de 4 celule. Acelaşi Lee afirmă că embrionul în cauză, în fază de 4 celule, ar fi putut fi implantat în uterul unei doici pentru a obţine pentru donatoarea lui o copie genetică identică. Acest lucru n-a fost însă făcut din considerente juridice şi morale.

Mulţi cercetători n-au dat crezare acestui experiment. Printre ei s-a numărat şi Dr. Harry Griffin, director adjunct la Rosalin Institut, adică exact acea instituţie care a clonat oaia Dolly, probabil şi datorită faptului că cercetătorii coreeni au utilizat o altă tehnică de clonare, cu mult mai eficientă, mai economică decât englezii în cazul Dolly.

Dezvoltarea tehnicii de clonare reproductivă este, fără îndoială, posibilă acum la om, ceea ce i-a determinat pe mulţi cercetători să anunţe deja momentul apariţiei primei copii umane. „Primul om va fi clonat în curând", anunţă revista Focus 8/2001. Experimentele sunt atât de sigure încât lumea va fi în curând şocată de primele rezultate. Obţinerea în laborator a unei copii a lui Homo Sapiens nu mai este o utopie. S-a trecut deja de la ficţiune la ştiinţă.

La sfârşitul anului 2000, biofizicianul american Gregory Stock a prognosticat că „primul copil clonat se va naşte în decursul viitorilor 5 ani". O estimate târzie, am spune noi, pentru că, iată, pe 26 ianuarie 2001, un alt consorţium ştiinţific condus de Severino Antinori face cunoscut faptul că „un embrion uman clonat va fi pregătit pentru implantare într-un uter uman în 18 luni". Având o clinică de specialitate în Roma, chiar sub nasul Vaticanului şi al Papei, Antinori susţine că va clona numai pentru obţinere unor „copii de calitate". El susţine că au deja cereri concrete de la 10 perechi care nu au altă posibilitate de a avea copii. Procedeul său este următorul: se recoltează celulele de la un corp masculin, cărora li se extrage nucleul care conţine materialul genetic şi pe care, apoi, îl transferă în celule goale pregătite în acest sens. Se realizează în felul acesta clona. Noua celulă embrion este apoi stimulată şi supusă unui proces de subdiviziune până se obţine un subembrion implantabil. Clona-copil obţinută va fi, în acest caz, un băieţel ce va deveni un bărbat cu însuşiri genetice asemănătoare donatorului de material genetic (nucleul).

În opinia autorului, el are disponibilitatea de a clona şi femei. Pentru a face o muncă de calitate, el selectează embrionii. „Dispunem de tehnologii formidabile.

Scanned with OKEN Scanner

Putem să selectăm embrionii în funcţie de calitate, putem să analizăm genele, putem să asigurăm un control de foarte bună calitate". Nu este o problemă simplă, noi clonăm oameni şi nu oi şi nu dorim să producem monştri.

Unul din colaboratorii lui Antinori, cercetător în reproducţie, Panayiotis Zavos, afirma la rândul său: „Umanitatea va decide, ea însăşi, dacă doreşte clone umane şi când se va realiza acest lucru. Eu cred însă că lumea este deja pregătită pentru a accepta această nouă supertehnologie."

Un caz aparte în consorţiile generatoare de clone umane îl prezintă secta religioasă RAEL din SUA care şi-a dezvoltat un puternic departament care se ocupă cu clonarea. Pornind de la ideea că „viaţa trebuie să existe", cercetătorii acestei secte şi-au propus clonarea oricărui sugar care moare din interiorul comunităţii sectei şi din afara ei. Cu alte cuvinte, secta „oferă nemurirea", iar clonele ar fi „un pas spre mântuire".

Există informaţii cum că, deja din 1997, mai multe perechi s-au adresat firmei „Clonaid" ce aparţine sectei şi care s-a autointitulat deja „prima firmă internaţională în domeniul clonării umane". Pentru 200.000 USD firma oferă un „Human-Cloning Service". Pentru numai 50.000 USD se oferă „nemurirea" prin congelarea clonelor ce ar urma să refacă viaţa unui client pe patul de moarte.

Nu ne putem exprima acum dacă Tro-Antinori, Clonaid sau un alt laborator va fi primul care va dedubla (duplica) un embrion uman. Cu mare probabilitate, prima copie umană va apărea într-o ţară a lumii în care clonarea nu este interzisă.

Foarte multe din statele Americii permit sau tolerează în acest moment clonarea umană. Acele state, mai puţin controlabile de către Occident, precum China, Coreea sau Libia, dispun şi ele de tehnologiile clonărilor şi este foarte probabil ca moralitatea să nu-i împiedice pe aceştia să o şi realizeze. Se poate afirma, cu siguranţă, că, în momentul de faţă există în lume peste 50 de echipe de cercetare care se ocupă de problema tehnicilor de clonare şi reproducţie umană pe această cale. Poate cineva să-i oprească să o facă? Cu siguranţă, nu.

Un alt posibil scenariu este adus lumii de Lee Silver, cercetător în biologie moleculară din Princetown. În cartea sa „Paradisul clonat", acesta prognozează că „în anul 2350 circa 10% din populaţia americană va deţine în moştenirea sa gene sintetice"* (transgene în special selectate). Aceştia vor fi sportivi de performanţă, cercetători de excepţie, în general superoameni, care pentru fantezia lui Liver depăşesc orice graniţă.

Scenariile lui Sloterdigks şi Silver se apropie foarte mult de tezele lui Aldos Huxley prezentate încă din 1932 în cartea sa „O lume nouă şi frumoasă" care atacă o temă posibilă: Clonarea combinată cu alte tehnici genetice care poate conduce la perfecţionarea biotehnologiilor reproducţiei şi că accesul la acestea va fi dirijat de preţuri şi deci, posibilitatea materială a indivizilor sociali. Să nu uităm că Lou Hawthorne a plătit 2,3 milioane USD pentru a-şi clona câinele muribund, un Huskie siberian (fig. 241). Au existat în istoria societăţii umane suficienţi nebuni care au gândit la împărţirea oamenilor în rase superioare, medii şi inferioare. Or, noile tehnologii ar da cu siguranţă şansa unor asemenea nebuni cu bani să pună în practică asemenea scenarii aberante.

* Gene sintetice nu există, este o formulare nefericită a lui Lee Silver - este vorba de gene dorite selectate conform metodelor prezentate în aceste cărţi.

Scanned with OKEN Scanner

Fig. 241 – O clonă de Huskie siberian în valoare de 2,3 milioane USD

Dar, poate cel mai mare rău pe care l-ar putea face manipularea clonării oamenilor este acela al distrugerii legilor ecologiei, ale naturii însăşi. Este vorba, în primul rând, de legile concurenţei între indivizi şi între populaţii. Natura este atât de inteligentă, încât ea a sugerat omului aceste biosupertehnologii, iar teama multor analişti este aceea că acesta, adică omul, va folosi aceste tehnologii tocmai pentru a înfrânge, a distruge natura, mediul şi biosfera.

Fireşte că sistemele politice, statale, religioase, adică instituţiile oficiale încearcă prin toate măsurile şi pe toate căile să impună legi care să reglementeze utilizarea biotehnologiilor genetice. Am arătat deja că în Germania şi Japonia, clonarea umană este interzisă. Clonarea copilor umane este practic interzisă în toată Europa. În America, unele state încearcă acum să reglementeze problema legislativ. Parlamentele lumii lucrează. Bisericile din toată lumea se opun cu fermitate duplicării omului.

Există deci un curent general, nu atât de ostilitate cât mai ales de dezbatere a problemei şi de reglementare a ei din punct de vedere etic, juridic, moral.

Spre exemplu, comitetul executiv al Comisiei Ecumenice Europene a mobilizat toate bisericile din Europa pentru a alcătui o grupă de lucru intitulată „Bioethik" care să dezbată toate probemele etice, morale, religioase şi chiar juridice ale tuturor problemelor legate de biotehnologii.

Grupa de lucru „Bioethik" a elaborat 10 întrebări care stau la baza discutării internaţionale a problemei. Aceste întrebări sunt următoarele:

1. Cum trebuie să utilizeze o societate capacităţile ei tehnologice?
2. Ce înseamnă clonă în corelaţie cu înţelegerea noastră despre lume?
3. Există condiţii care să solicite aplicarea tehnicii de clonare la animale?
4. Poate fi acceptată clonarea animalelor pentru ameliorarea performanţei economice a acestora sau nu?
5. Ar trebui oare admis vreodată ca omul să fie clonat? Care ar fi în acest caz pericolele etice, dar mai ales reale, concrete?

Scanned with OKEN Scanner

6. Care ar fi condiţiile care imperios ar putea, etic, acceptabil, să utilizeze tehnica clonării în medicina umană sau în cercetările veterinare?
7. Este oare etic acceptabilă cercetarea şi clonarea embrionilor umani clonaţi?
8. Este oare etic de acceptat să cercetăm reprogramarea în timp, pe om şi animale, privind obţinerea unor organe de înlocuire sub rezerva că acest lucru este posibil din punct de vedere tehnic?
9. Cum ar putea fi controlată o asemenea cercetare şi care ar fi responsabilităţile faţă de societatea publică?
10. Unde sunt graniţele noţiunilor tehnice în transplantele umane, la refuzarea unor organe şi în funcţie de îmbătrânire?

Aceste întrebări au fost formulate cu mult înainte (acum 3 ani), sub iminenţa apariţiei clonelor umane. Răspunsul la aceste întrebări ocupă mii de pagini. O sinteză a lor se găseşte însă pe Internet sub titlul: **„Das Klonen von Tieren und Menschen"** şi poate fi consultată de cei doritori la adresa http:/www.cec.kek.org.deutsh/cloningd.htm.

În esenţă, trebuie reţinut faptul că între clonarea animalelor şi plantelor în scopuri economice şi medicinale şi clonarea omului, indiferent în ce scop (căci nu poate fi vorba de scopuri economice directe) **trebuie făcută o mare diferenţă.**

O diferenţă esenţială trebuie făcută între clonarea umană medicinală (terapeutică) şi cea reproductivă, ultima fiind respinsă de majoritatea guvernelor şi de toate cultele (mai puţin unele secte). Dezbaterile continuă însă şi, cu cât ne apropiem de momentul real al apariţiei unei dubluri umane, cu atât mai înfierbântate sunt minţile tuturor.

În ceea ce mă priveşte, cred că fenomenul este oarecum asemănător „bombei atomice" sau mai bine zis energiei nucleare. Omenirea va reuşi să folosească avantajele terapeutice ale clonării şi să ţină sub control clonarea reproductivă. Şi totuşi, nu pot neglija afirmaţia lui Richard Seed care, de curând afirma: „Cu toate că clonele respective sunt interzise în majoritatea statelor lumii, iar America face şi ea eforturi pentru introducerea unor legi foarte severe, cercetările în această direcţie se derulează cu viteză maximă. **Clonarea omului nu mai poate fi stopată. Într-un fel sau altul ea va fi realizată.**

În România fenomenul nu este luat în seamă, nu este discutat, nu este dezbătut. Semn că România are probleme de supravieţuire. Sunt convins însă că atunci când se va pune realmente problema aderării la Uniunea Europeană, România va trebui nu numai să dezbată, dar mai ales să-şi însuşească legislaţia europeană, oricare ar fi ea.

Oricum, nu-mi pot imagina prea curând clonarea unui român. ■

8.1.5. Pro şi contra clonării umane

Arătam mai sus că unul din descifratorii genomului uman, Craig Venter crede mai puţin în dorinţa umanităţii de a se clona şi că marii monştri ai lumii nu pot fi clonaţi. Concurentul său principal, Francis Collins, la rândul său unul din liderii discrifrării genomului, într-o conferinţă ştiinţifică internaţională ţinută la începutul lui februarie 2001 la Lyon, spune: **„Sunt convins că oamenii se vor elibera în întregime din sertarele biologiei şi VOR PRELUA CONTROLUL ASUPRA PROPRIEI LOR EVOLUŢII".**

Scanned with OKEN Scanner

Planul evoluției optimizării genetice a reproducției se prezintă ca unul conservativ, după modelul britanic. În circa 20 de ani cercetătorii vor elibera moștenirea noastră din genom și vor rezolva problemele tuturor bolilor. „Suferința pământeană va fi eliminată, se vor naște numai copii sănătoși, conform normelor dorite."

Am ținut mult să avem și părerea lui Collins pentru că, spre deosebire de colegul său Venter, el integrează clonarea umană tehnologiilor genetice de îmbunătățire a construcției organismului uman, ceea ce Venter încă nu acceptă. Collins vede, așadar, o omenire formată numai din oameni sănătoși, perfect construiți genetic, indiferent dacă clonarea joacă aici un rol major sau nu.

Cine va fi primul clonat? Greu de spus, însă, numeroși cercetători, căci aceștia sunt principalii membri pro clonare ai societății umane, ar prefera să-l cloneze cu prioritate pe Bill Clinton. Nu se explică de ce există această dorință, dar ea există. Române de văzut dacă dl Clinton va subscrie acestei năstrușnice idei. Asta era însă în 1999-2000. Nu știu dacă astăzi aceiași cercetători americani ar vrea să-l cloneze pe dl Bush Jr. Cred că entuziasmul este mai mic ținând cont de restricțiile impuse de guvernul domnului Bush cercetărilor în această direcție.

Există însă, la nivelul societății umane, o serie întreagă de păreri și temeri legate de clonarea umană, unele greu de explicat, altele naive. Vom selecta câteva dintre ele.

Un sondaj efectuat de revista americană „Time Magazine" pe mai mult de 5000 de subiecți, a scos în evidență următoarele:

a) În procesul de reproducție, clonele elimină pasiunea, dragostea, sufletul (25%).
b) Oamenii care se nasc prin clonare n-ar fi „oameni reali" ci doar niște „marionete tâmpite" (20%).
c) Noile creații, tocmai pentru că sunt identice genetic, ar fi lipsite de o personalitate proprie (adică sunt copii fără personalitate) (20%).

Desigur, majoritatea răspunsurilor date sunt naive, dar ele implică o anumită stare de spirit a populației. Există vădit teama că aceste „dubluri" ar putea, sau cel puțin în spațiu, să ia locul unui „născut normal". Firește că personalitatea se formează nu numai genetic (moștenirea) ci, mai ales, în relațiile ei cu mediul. O clonă, o dublură poate suferi toate transformările educaționale, sociale, emoționale ca și o naștere normală.

Oamenii de știință refuză însă, în momentul de față să creadă că, cel puțin în următorii 100 de ani, ar fi posibilă crearea unor copii perfecte și totale ale unor personalități precum Einstein, Maica Teresa, Hitler, Stalin sau alții.

Există și o teamă care are un suport mistificat, generată de contestatul filozof Peter-Sloterdigk și propagată în cartea sa „Menshenpark" (Parcul oamenilor) care consideră că prin clonare manipulată se poate ajunge la dezavuarea unui anumit „eu genetic" pozitiv. El și un număr mare de geneticieni umani văd, în mod șocant, în procedeul clonării, combinat și cu alte tehnici genetice, o șansă pentru „optimizarea omenirii". Acest concept consideră posibilă schimbarea materialului genetic moștenit, ca și posibilitatea utilizării altor modificări transgenice.

Noi considerăm că acest concept prezentat mai sus nu este simplă filozofie. El atrage atenția asupra faptului că, dacă asemenea procedee superbiotehnice nu sunt controlate, pot naște superoameni, monștri sau alte „aberații umane dorite de creatorul lor, să-i zicem azi un cercetător nebun". ■

Scanned with OKEN Scanner

8.1.6. Implicații etice, filozofice, morale

„Dacă oamenii doresc să aibă un copil care să cânte bine la pian eu sunt sigur că și așa ceva va fi posibil, însă va mai dura mulți ani" afirmă Gearhart D.J., profesor de ginecologie la o școală superioară de medicină din Baltimore. Foarte recent, rubrica de știință a revistei Focus anunță, la rândul ei, că primul baby clonat va apărea în 5 ani. Comentând rezultatele obținute de biotehnologia umană, filozoful Bernard M.F. Taureck, profesor la Universitatea tehnică din Braunschweig, afirmă: „Se apropie o nouă eră, denumită „era postbiologică"" Ea nu se mai ocupă cu adunarea cunoștințelor biologice și stabilirea legilor care o conduc ci omul, noi înșine, devenim constructori creatori ai vieții". Firește că mulți filozofi și comentatori ai științei se întreabă dacă „avem noi, oamenii, o dimensiune biologică, o măsură a lucrurilor"! Este oare, omul îndreptățit să preia rolul tuturor lucrurilor de pe pământ? Probabil că omul se va schimba acum decisiv, o dată ce științele vieții au pătruns profund în informația existenței sale, iar creierul uman poate fi șlefuit după forța financiară a clientului, în timp ce calculatoarele care se construiesc se adaptează creierului nostru.

Nu cumva a devenit deja omul măsura vieții? Numeroși filozofi și moraliști vorbesc deja despre depășirea normelor vieții. Realitatea este că într-o zi omul va deveni el singur MĂSURA VIEȚII. Nu este exclus însă ca, prin atingerea acestei limite, el, omul, măsură a vieții, să poată deveni „sfârșitul unei LUNGII ISTORII A SPECIEI UMANE", afirmă Taureck.

Aceste judecăți filozofice nasc la rândul lor alte întrebări: Cine trebuie să fie „NOUL OM care să dea acum măsura vieții?" Și dacă omul schimbă viața și o reordonează, o recrutează chiar, cum putem ști că el este omul vechilor timpuri, adică cel dinaintea erei postbiologice?

Lumea postbiologică va reduce drastic numărul de specii și cu siguranță se va ridica și problema speciei umane. În ce fel? Gândesc oare biotehnicienii un anumit tip de om, care nu va mai fi „doar subiect" ci mai degrabă „obiect al proceselor de transformare a vieții"? Cum se poate imagina acest tip? Încă din antichitate se vorbea despre oameni sau superoameni. Literatura SF e plină de ei. Nitsche afirma cândva că „superomul este o noțiune care înlocuiește lipsa noastră de cunoștințe". În nici un caz nu trebuie să ne închipuim să supraomul ar putea fi considerat ca un „expert" al erei postbiologice.

Taureck încearcă să dea câteva răspunsuri și anume:

a) O măsură a tuturor măsurilor nu poate fi disponibilă.
b) Dacă limitele speciei sunt depășite, ceea ce rezultă nu mai sunt mostre ci riscuri deosebite.
c) În spatele acestor mostre umane mult așteptate ar putea, în principiu, să spioneze un monstru real și foarte periculos.
d) Chiar și utilizarea clonelor în medicină în vederea optimizării sănătății nu închide drumul. Este de presupus că realizările biotehnologice destinate medicinei nu se vor opri numai la medicină, așa cum energia atomică n-a fost utilizată numai în centralele atomoelectrice. Cu cât se vor realiza procese postbiologice mai revoluționare, cu atât se va naște un „bineînțeles". Bineînțeles

Scanned with OKEN Scanner

că vom avea dreptul la o „măsură colectivă a vieții". Ca să ne jucăm cu viața vom solicita dreptul colectivității de a dispune de această măsură. Ce se va întâmpla însă dacă colectivitatea va dispune și de indivizi din care gena criminalității n-a fost eliminată complet? Cu siguranță că măsuri juridice severe vor trebui să limiteze dinamica postbiologică în scopul nelezării drepturilor omului biologic și a protecției acestuia. ■

8.1.7. Chestiuni politice și religioase - marea dilemă

Politicienii momentului, trăitori ai realizărilor științifice deosebite, sunt puternic derutați. Datele problemelor legate de existența umană se schimbă cu repeziciune, iar birocratismul politic nu are timp să reacționeze prompt la aceste schimbări. De cele mai multe ori cercetătorii dețin forța schimbării și nu politicienii. Și totuși, o nouă politică trebuie gândită și, ținând cont de amploarea realizărilor biologice și implicațiilor lor în viața economică și socială, s-a născut termenul de biopolitică, un nou concept în favoarea căruia trebuie strânse cât mai multe valori, nu numai științifice dar mai ales filozofice și doctrinare. Se naște, așa cum s-a văzut, o nouă societate, cea postbiologică, o societate exclusiv științifică, în care, repetându-l pe Taureck, ne întrebăm: „Care om al pământului ar putea fi **modelul vieții umane**?" Modelul de biopolitician, modelul de bioparlamentar, de biopreședinte sau de biodictator? Există oare o biodemocrație? Ar trebui să fie, dacă lucrurile evoluează normal. Dar poate fi și altfel.

Până atunci știm că politica americană este foarte flexibilă privind dinamica revoluției postbiologice. În Europa lucrurile stau altfel. Premierul Tony Blair a luat un avans considerabil de ordin decizie biopolitică în fața cancelarului Schröder care este obligat să ridice barierele conservative și să impună prin lege libertatea cercetărilor discutate aici. „Ceea ce la noi este interzis, este permis în țările vecine, iar noi trebuie să importăm" declara cancelarul german. Cu siguranță că de îndată ce Franța va debloca legislația utilizării clonelor în medicină, Germania o va face și ea în regim de urgență. Politicienii, oricât de conservatori ar fi ei, nu se vor putea opune revoluției biotehnologiei, fie și datorită faptului că acea țară, care va persista în conservatorismul ei, va fi confruntată cu imense pierderi financiare. Nivelul biotehnologiilor viitoare va stabili decisiv ierarhia marilor puteri economice și politice ale lumii. Or, astăzi America are în acest domeniu un avans considerabil care în opinia noastră nu va putea fi recuperat. Din aceste motive, decizia lui Tony Blair n-a putut fi contestată de nimeni și a avut sprijinul popular. Ar fi fost prea periculos ca America că alerge singură pe acest drum.

În ceea ce privește poziția bisericii care, foarte frecvent s-a opus transformării vieții, considerând că „viața nu poate fi creată decât de Dumnezeu", ne permitem să afirmăm că multe s-au schimbat și în concepția capilor bisericii. Într-un interviu dat postului de radio „Radio Berlin" în data de 15.09.2000 ora 18^{05}, Wolfgang Huber, episcop evanghelic al Berlinului și Brandemburg-ului, susținea că acceptă aceste tehnologii atâta vreme cât „embrionul este creat numai pentru celule și țesuturi și nu ca un potențial creator de viață" și mai spunea domnia sa: „Trebuie găsit un compromis

Scanned with OKEN Scanner

în care embrionii să fie utilizaţi pentru salvarea oamenilor atunci când mama nu mai doreşte copilul. Sunt pentru acest compromis".

Politicienii, umaniştii, preoţii şi toţi factorii de decizie care se opun încă folosirii clonelor în terapia celor mai grave boli ale omenirii, sunt puşi în faţa unei teribile dileme. Dacă în ţara ta, Germania, ai 250.000 bolnavi de Parkinson şi 10.000 de Huntington, aproape toţii fiind destinaţi morţii, dar care au posibilitatea să fie salvaţi şi aduşi la o viaţă normală, ce decizie trebuie luată?

J. Gearhart se întreabă şi el: „Au nevoie bolnavii să primească noua terapie sau se preferă moartea lor?" Episcopul Huber afirmă, la rândul lui: „Dacă un om este bolnav de Parkinson sau Alzheimer, eu nu spun că el trebuie să rămână bolnav pentru simplul motiv că boala aparţine omenirii. Da, boala aparţine omenirii, însă eu totdeauna voi dori bolnavilor ca ei să poată fi vindecaţi". Cine îşi asumă răspunderea ca ei să nu fie vindecaţi, dacă ei pot fi vindecaţi, ne întrebăm şi noi. Reversul este şi el valabil. Cine îşi asumă responsabilitatea efectelor greu de controlat ale exploziei biotehnologiei asupra evoluţiei speciei?

O dilemă care va da multe bătăi de cap experţilor şi politicienilor lumii. ■

8.1.8. Sunt necesare reguli şi legi

S-a observat deja din paginile anterioare că pericolul poate fi mult prea mare dacă nu se ordonează legislativ, la scară planetară modul de cercetare şi implementare a tehnicilor genetice. Încă din 1974 a devenit clar că manipulările genetice aplicate plantelor, animalelor şi oamenilor nu convin multor politicieni şi economişti, filozofi şi preoţi. Nu convin şi pentru faptul că „lumea trebuie să se schimbe". În bine, dacă tehnicile sunt gândite şi conduse pozitiv, sau în rău dacă se întâmplă invers. Deja de la începuturile declanşării cercetărilor şi a obţinerii primelor rezultate convingătoare, presa a reacţionat virulent prin titluri ca „Jocul de-a Dumnezeu", „Manipularea mediului viu", „Cercetarea s-a rotit cu 180 grade" sau „Evoluţia artificială". Lumea începe să fie concepută ca urmare a presei ca o „existenţă a groazei". Presa face un amestec teribil de realităţi şi SF, transformând chiar şi rezultatele extrem de favorabile din punct de vedere economic şi financiar într-un **pericol pentru umanitate**. Opinia publică nu trebuie lăsată numai la cheremul presei într-o chestiune ştiinţifică şi tehnologică atât de importantă. Autorităţile, instituţiile statului trebuie să se implice şi să creeze **cadrul legislativ necesar cercetării şi promovării tehnicilor genetice, să stabilească limitele şi graniţele până unde se poate merge pe acest drum.**

Tema principală ce trebuie atent monitorizată este aceea a proiectelor privind tehnicile de recombinare a ADN-ului.

Pe această temă, principalul finanţator al programelor americane pentru sănătate (NIH - US National Institute of Health) a emis încă din 1976, sub formă de legi, liniile directoare privind modul de întocmire, de finalizare şi implementare a proiectelor finanţate de ei pe tema tehnicilor de recombinare a ADN-ului. Legislaţia emisă prevede norme foarte severe, în funcţie de felul experimentelor planificate, mai ales în domeniul siguranţei produselor obţinute în laboratoare. Sunt prevăzute prevederi de siguranţă pentru fiecare „lucrare genetică".

Scanned with OKEN Scanner

- Fiecare produs nou trebuie să fie prevăzut cu un mecanism, de regulă de natură proteică (un fel de bombă proteică) de autodistrugere în caz că el scapă în mediu, unde ar putea crea adevărate probleme sau catastrofe ecologice.
- Ca organisme gazdă pentru transportul ADN-ului în organismele ţintă ce trebuie modificate prin implantări de gene OMG, se vor folosi de preferinţă acele microorganisme care nu au capacitatea de a se înmulţi în afara laboratorului, sau care trebuie transformate să răspundă acestui deziderat.
- Tot în acest scop, şi mai ales pentru faptul că în laboratoarele de transferuri şi produse genetice se lucrează cu microorganisme patogene (bacterii, virusuri, etc.) s-au luat prin lege măsuri speciale de cantonare a acestora în spaţii foarte închise şi controlate, iar întregul laborator va fi protejat cu filtre speciale de reţinere a oricărei microfiinţe care ar avea tentaţia să scape în mediu.
- Personalul este şi el echipat corespunzător pentru a lucra în condiţii de siguranţă.

Aceste directive au fost preluate şi de alte ţări ca „modele": Germania, de exemplu în 1978 a elaborat o legislaţie asemănătoare, elaborată de Ministerul Federal pentru Cercetare şi Tehnologie intitulată „Directivă pentru protecţia împotriva pericolului rezultat din noile combinări *in vitro* ale acizilor nucleici".

Normele NIH, nefiind obligatorii pentru cercetarea privată, numeroşi cercetători din această zonă le-au considerat şi le consideră încă foarte stricte, greu de acceptat şi, firește, nu le-au respectat ţinând cont şi de costurile enorme pe care le implică aceste măsuri de supersiguranţă. Modificarea lor a necesitat înfiinţarea unui comitet intitulat „NIH Recombinat-DNA Advisory Committee" (NIH - RAC).

Noul comitet a primit sarcina monitorizării tuturor realizărilor privind tehnicile genetice şi în caz de necesitate să modifice liniile directoare într-un sens sau altul (fie să strângă, fie să relaxeze cureaua - după necesităţi). Toate deciziile luate ca urmare a unor foarte competente dezbateri au fost cuprinse în protocoale de lucru şi apoi publicate, pentru informare inclusiv a celor care nu sunt membri ai organizaţiei.

Un paragraf al directivelor iniţiale interzicea efectuarea unor experimente care creau organisme modificate genetic pornind de la ADN-recombinat. Ulterior s-a renunţat la acest paragraf iar astăzi OMG-urile cuprind o mare întindere din agricultura americană.

Experienţele NIH s-au diminuat şi mai mult după 1980 când s-a constatat că E-coli K-12, folosit ca organism gazdă pentru experimente de transfer genetic, nu se poate înmulţi în afara laboratorului. Autorităţile au căpătat mai mare încredere atât în microbiologi cât şi în geneticieni, nesupraevaluând măsurile de siguranţă şi aşa foarte strânse.

Cu toate acestea, directivele au fost completate cu anumite prevederi care să acopere gaura provocată de utilizarea OMG-urilor în domeniul fermentaţiei unor volume mari de materiale organice. Acest lucru a fost limitat, dar se pare că în ultimii ani s-a acceptat utilizarea de OMG-uri de natură microbiologică, inclusiv în domeniul decontaminării materialelor organice de elemente poluante.

Scanned with OKEN Scanner

În Germania, țară cu o atitudine extrem de conservatoare față de tehnicile genetice, „Liniile directoare" pentru protecția împotriva pericolului rezultat din recombinarea *in vitro* a acizilor nucleici a fost modificată numai până în 1986 de 5 ori. Bundestag-ul german a inițiat în 1984 o comisie de anchetă pe tema „Șansele și riscurile tehnologiilor genetice". În 1990, urmare a acestei anchete a apărut Legea Gentehnologiei, dar numai 3 ani mai târziu a fost din nou modificată. Astăzi, OMG-urile nu sunt acceptate la plante și animale în Germania, dar legea nu este prohibitivă. Țări ca Spania, Franța, Portugalia, Grecia folosesc OMG-uri; Germania încă nu, dar le va accepta cu siguranță. În ceea ce privește modificarea genetică la oameni, tema rămâne închisă la nivelul întregii UE.

O mare deficiență a legii referitor la măsurile de siguranță luate de NIH - RAC este aceea a imposibilității extinderii măsurilor directivei asupra cercetării private. Acceptarea în piață a OMG-urilor a creat o reală problemă asupra naturii (ce fel de?) măsurilor ce trebuie luate referitor la alimentele de proveniență OMG sau care conțin asemenea produse. În sfârșit, o a doua problemă care se pune este: **Cum poate fi monitorizată utilizarea OMG-urilor în lume.**

Legea mai are dificultăți legate și de utilizarea unor OMG-uri care prin polen pot impurifica genetic culturile de rapiță ale acelor cultivatori care nu doresc acest lucru. Pe această temă în Canada și America de Nord sunt în derulare procese juridice de anvergură între producători și marile firme care comercializează OMG-uri.

În fine, o altă problemă pentru care legiuitorii lumii se zbat acum este aceea de a include în procedeul obișnuit de omologare a medicamentelor, inclusiv pe cele care provin din procedeul biotehnologic genetic. În aceeași ordine de idei se înscrie și personalul care operează cu tehnicile genetice. ■

Scanned with OKEN Scanner

9. SIGURANȚA PRODUSELOR AGRICOLE, FURAJERE ȘI A ALIMENTELOR

Alimentele care conțin un anumit procent de material organic modificat genetic sau care provin integral din OMG-uri sunt denumite **Alimente Modificate Genetic.** Termenul este introdus de Kristina Pelli și Marika Lyly de la VIT Biotechnology Finland (NRA - Paris, 4 - 2003). Noi nu acceptăm termenul pentru simplul motiv că prin procesare în alimente, genele care au participat la inducerea modificării nu se mai regăsesc. Dacă în soia, transgena poate fi identificată, în carnea porcului care a consumat această soie ea nu se mai regăsește și, ca atare, nu putem spune că „friptura de porc este modificată genetic". S-ar putea spune că tratăm lucrurile cu simplitate, dar nu avem argumente științifice prin care să afirmăm că un porc care a ingerat prin furaje gene modificate, ar suferi el însuși o transformare. Pentru că ar fi prea simplu este deci imposibil.

Cu toate acestea, nimeni nu neglijează calitatea alimentelor provenite din OMG-uri.

În SUA instituția responsabilă de omologările și reomologările alimentelor, medicamentelor, a substanțelor farmaceutice și a aparaturii medicale, este denumit Food and Drug Administration - pe scurt FDA. Această instituție controlează cu maximă responsabilitate toate produsele organice de proveniență agricolă sau neagricolă care intră în fabricarea furajelor și a alimentelor, inclusiv substanțele, adaosuri alimentare, corectori de gust, arome etc. Numai dacă rezultatele studiilor sunt pozitive, ele sunt acceptate pentru alimente. Există însă suficienți critici care susțin că FDA nu ar avea reglementări suficient de stricte pentru protecția consumatorilor. Și totuși, atât FDA cât și industria de alimente reprezentată de International Food Biotechnology Council (IFBC) susțin că în legislație există astăzi, în cazul alimentelor fabricate din produse obținute prin M.G., mult prea multa birocrație. De aceea, ei au limitat îngrădirile vizând calitatea produselor la: toxicitate, alergitate, puritate, igienă etc., acestea fiind cele care influențează negativ calitatea alimentelor pentru care responsabilitatea o poartă în întregime producătorii.

Așadar, dacă un aliment pornind de la OMG-uri trece testele de mai sus, el este acceptat ca aliment, pentru simplul motiv că nimeni nu a demonstrat că acest lucru nu este adevărat. Cu toate acestea, și pentru informarea consumatorilor, atât în America, iar mai recent și în Europa, cu precizarea că în Europa alimentele n-ar trebui să conțină mai mult de 1% produse care provin din noul sistem OMG, alimentele sunt etichetate special. Relaxarea europeană este însă foarte aproape.

Pentru UE în plus OMG-urile sunt interzise prin lege dar încet capătă pe rând „dispensă" pentru a fi cultivate și utilizate. Până în prezent, în UE, au fost prezente pe piață numai porumbul și soia modificate genetic, iar în 1998 au fost interzise. Prea târziu însă. Ele nu mai pot fi scoase din sistemul de producere al alimentelor în ciuda tuturor interdicțiilor.

Scanned with OKEN Scanner

În momentul de față, situația mondială a culturilor modificate genetic este următoarea:

- Au fost introduse pe piață în 1995.

Față de această dată ele au crescut astfel:

- Cu 12% în 2002
- Cu 15% în 2003 față de 2002, ajungându-se la o suprafață mondială de 67,7 mil. ha. Creșterea a fost deci exponențială.
- 7 milioane fermieri din 18 țări cultivă plante modificate genetic.
- 85% dintre ei aparțin țărilor dezvoltate.
- Există și țări care cultivă suprafețe mai mici precum China, Africa de Sud, India, România, Mexic, Spania, Filipine, Columbia, Honduras.
- Repartiția pe culturi este prezentată în figura 242.

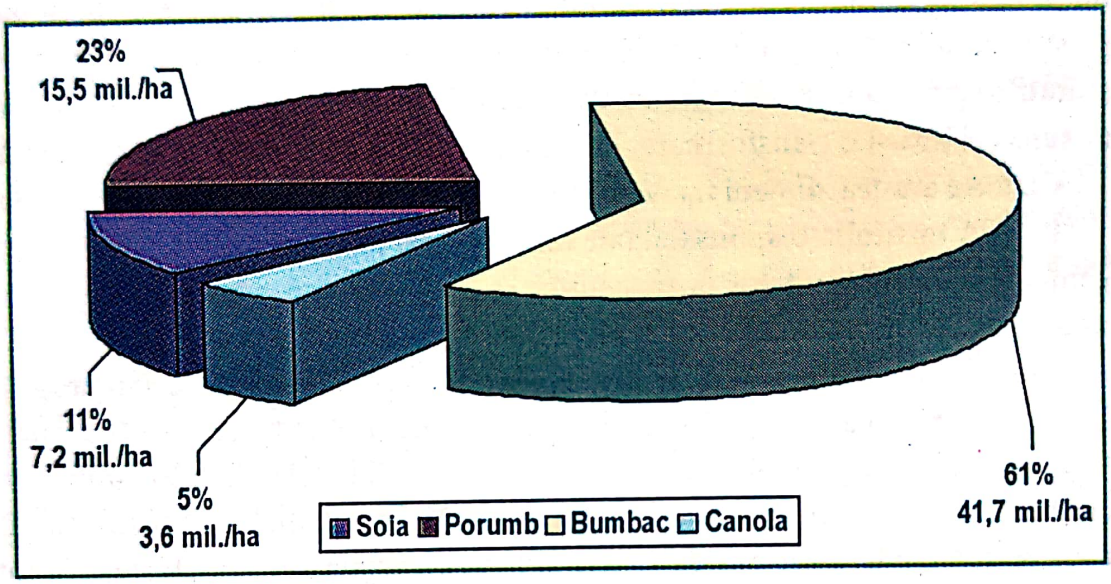


Fig. 242 – Repartiția suprafețelor OMG pe produse la nivel mondial

Tabelul 243

Primele 5 țări cultivatoare de plante modificate genetic

Țara	Suprafața mil. ha	% din total cultivat
SUA	42,8	63
Argentina	13,9	21
Canada	4,4	6
Brazilia	3,0	4
China	2,8	4

Sursa: James, 2003

Statele Unite și-au diversificat însă foarte mult prezența OMG-urilor în culturi, utilizând astăzi procedeul la roșii gustoase și rezistente la păstrare, dovlecei rezistenți la virusuri, soia și porumb cu conținuturi diferite de acid oleic, respectiv proteine. În tabelul 243 se prezintă și primele 5 țări cultivatoare de plante modificate genetic din lume. ■

Scanned with OKEN Scanner

9.1. PROBLEMA CHIMOZINEI

Se întâmplă uneori ca practica s-o ia înaintea oficialităţilor care se ocupă cu omologarea produselor ce intră în componenţa alimentelor sau participă la fabricarea lor. Un caz special îl reprezintă **chimozina**. Cunoscut şi sub denumirea de **rennina**, acest ferment destinat coagulării laptelui şi fabricării brânzeturilor se găseşte în stomacul unor mamifere şi este folosită ca şi cofactor de coagulare a x-caseinei. Este deci o proteină hidrolitică care hidrolizează laptele. Prin această enzimă de separare, laptele se depune sub formă de floculaţie şi poate apoi fi preparat ca brânză. Până nu demult substanţa era extrasă din sfertul superior al stomacului vițelului (lab) după care a fost preparată prin amestec cu alte substanţe. Procedeul era însă costisitor şi de fiecare dată necesită sacrificarea unui număr relativ mare de viţei.

Pentru a obţine comod şi ieftin o cantitate mare de chimozină s-a apelat la tehnicile genetice şi anume:

S-a depistat o genă care exprimă producerea de chimozină care a fost clonată, introdusă în E. Colli K-12 unde s-a exprimat producând pe medii de cultură produsul care apoi a fost izolat şi purificat. Produsul s-a constatat identic din toate punctele de vedere cu cel original şi a fost imediat introdus în fabricarea brânzeturilor. Analizându-se produsul prin cartarea restricţionară, hibridarea ADN şi secvenţionarea ADN, s-a ajuns la concluzia că secvenţa ADN a clonei ca şi a genei naturale a chimozinei sunt absolut identice. Şi ceilalţi parametri fizici şi chimici erau identici. Urmarea a fost aceea că FDA a omologat produsul fără a mai face vreun test, el fiind astăzi utilizat pe toate meridianele. ■

9.2. CAZUL TRIPTOFAN

Nu la fel stă cazul cu produsul triptofan, un aminoacid de mare valoare ce trebuie să fie prezent în alimentaţia animalelor şi a omului. Fiecare cerere de omologare este tratată cu deosebită atenţie de către o comisie de aşa manieră ca el să nu inducă nici un risc alimentului final. De aceea, numărul de teste este uneori foarte mare. Omologarea triptofanului a fost demult făcută în America.

Şi totuşi, în perioada 1989-1990 au apărut în America un număr foarte mare de cazuri de sindrom eusinophilic-mialgic (EMS). Aceasta este o boală foarte rară, dar grea pentru că induce o contractare dureroasă a muşchilor însoţită de un blocaj respirator urmat de moarte. O caracteristică comună a tuturor pacienţilor bolnavi de EMS a fost că toţi aceştia se aprovizionau din aceeaşi sursă şi anume de la aceeaşi firmă chimică. Până la acel moment nu se înregistrase în America nici o intoxicaţie alimentară cu triptofan. Cercetări ulterioare au demonstrat că triptofanul toxic a fost produs prin modificarea genetică a unei bacterii care a sintetizat în cantităţi mari pe mediul de cultură acest produs. Era vorba de o nouă suşă de bacterii pe care producătorul a crezut-o identică cu cele folosite până atunci şi care erau omologate. Ca urmare, nu au mai fost făcute teste.

Scanned with OKEN Scanner

Analizele chimice care au fost făcute după aceea au demonstrat că preparatul comercial obținut cu ajutorul unei suşe modificate genetic şi vândută sub marca comercială de triptofan a fost de fapt o substanță de schimb necunoscută a derivaților care conduc spre triptofan şi anume 1 - 1' - etilenbis (triptofan) (EBT). Inițial s-a presupus că aceasta ar fi o substanță de schimb a noii suşe în drumul său spre aminocid. Cercetările care au urmat s-au concentrat pe ideea de a stabili dacă EBT este cauza provocării EMB. Surpriză însă, cercetările au demonstrat că s-au sintetizat suşe sălbatice ale EBT. Studiile de toxicitate efectuate pe animale au demonstrat că EBT a determinat apariția unor modificări patologice la aceste animale, modificări provocate de EMS dar care în mod surprinzător au fost rezolvate chiar prin aplicarea triptofanului pur. Urmare acestei întâmplări, triptofanul a fost interzis ca adaos alimentar în SUA. Nu a putut fi însă clarificat nici până azi în ce fel EBT a putut să ajungă într-un produs inimaginabil. Conform declarațiilor mai multor experți, fabricarea triptofanului a fost contaminată cu EBT, urmare modificării procesului de purificare. Este de presupus că procedeul tehnologic precedent a condus la îndepărtarea EBT, efectiv, fără ca producătorul să aibă idee de aşa ceva.

Această poveste intens mediatizată a condus la constatarea că orice schimbare în originea şi modificarea genetică a microorganismelor poate să influenteze semnificativ însuşirile produsului fabricat. Aceasta înseamnă că în ciuda unor costuri ridicate, producătorii trebuie să accepte testele de calitate conform principiului: „Siguranța alimentelor are prioritate totală". ■

9.3. O NOUĂ PROBLEMĂ - SOMATROPINA BOVINĂ

Asupra noilor tehnologii genetice, cel puțin acum la începutul lansării lor, a implementării lor în viața societății, ea, societatea, trebuie să gândească mult şi să aprecieze foarte bine riscurile şi siguranța lor (mai ales când se ştie că sunt componente ale lanțului alimentar).

Bovin-somatropin - BST sau somatropina bovină nu este altceva decât un hormon de creştere pentru bovine (bovine growth horsomatotroph) - BGN. El nu este un hormon oarecare ci este unul din cele mai active şi sigure tratamente dar care nu este neapărat socotit o binecuvântare pentru progres de către autorități. Fiind vorba de o proteină, mai exact un hormon peptidic, somatotropina cunoscută şi sub denumirea de somatomedine, se formează pe cale naturală în ficat şi rinichi de unde este extrasă, purificată şi injectată ca stimulator de creştere. De la descoperirea ei acum 30 de ani, creşte pe an ce trece numărul tratamentelor cu BST în vederea măririi producției de lapte la bovine. Obținerea pe cale naturală în cantitățile mari cerute de piață a BST este şi grea şi scumpă şi de aceea tratamentul nu poate deveni unul de rutină pentru economia laptelui.

Tehnicile genetice au permis şi în acest caz clonarea genei BST şi prin introducerea genei în *E. coli* aceasta s-a exprimat producând prețiosul hormon. În laborator, pe medii de cultură produsul a fost apoi recoltat şi purificat fiind disponibil în cantități

Scanned with OKEN Scanner

mari şi ieftine pentru producţie. În condiţii de cercetare, prin injectarea BST în animal producţia de lapte a vacilor creşte cu 25-30%.

Studiile efectuate asupra însuşirilor sanitare ale laptelui - BST au fost efectuate amănunţit, conţinutul în BST din laptele obţinut fiind în aceeaşi concentraţie ca la varianta control, adică netratat.

Studiile efectuate la oameni au demonstrat că produsul nu este activ în corpul uman, iar cercetările toxicologice nu au relevat nici un fel de efecte negative la animalele testate. Cu toate acestea, FDA evaluând toate rezultatele puse la dispoziţie de cercetare a decis că **atât laptele cât şi carnea sau alte preparate provenite de la animalele tratate cu BST sunt periculoase pentru om.**

Biroul American pentru Monitorizare şi Evaluare Tehnologică (US Office of Technology Assessment), evaluând la rândul său o serie de alte cercetări, ajunge la aceeaşi concluzie.

Se pune, firesc, întrebarea: de ce şi cum s-a întâmplat acest lucru? Răspunsul este unul de natură politică şi nu economică. Împotriva produsului, unul din cei mai perfecţi regulatori de creştere cunoscuţi vreodată, s-a efectuat un antiloby de o energie neobişnuită, extrem de costisitoare, care a condus la neomologarea produsului. Prezumtivele efecte economice ale utilizării BST pentru industria laptelui din SUA vizau marile companii producătoare şi prelucrătoare de lapte care au finanţat antiloby-ul şi care au blocat cu ajutorul unor politicieni, profitând de o campanie electorală, omologarea produsului. Produsul ar fi avantajat micii producători în concurenţa lor cu marile companii. Aceeaşi cantitate de lapte ar fi putut fi obţinută cu un număr cu 30% mai redus de vaci, iar preţurile sub presiunea producţiei mărite ar fi trebuit să scadă. Chiar şi unele mari cooperative ar fi fost afectate. Asemenea argumente politice, fals economice, ar putea fi reale pentru anumite grupe de interese, pentru o prezumtivă alterare a existenţei lor. Ea nu va putea fi de durată şi nu va servi în nici un caz progresului societăţii umane.

Campania de denigrare a produsului BST desfăşurată în mod deosebit prin presă, a cuprins două componente, fiecare fiind demontată ştiinţific de cercetătorii neutri şi foarte avizaţi.

1) BST este un **hormon sintetic** (am subliniat sintetic pentru că el nu este deloc sintetic ci unul obţinut prin modificarea genetică a unei bacterii şi este deci un produs 100% biologic) şi care este dăunător sănătăţii oamenilor pentru că ar putea să producă cancer, susţin partizanii anti BST. Nimeni însă, nici din cercetare şi nici din altă categorie a profesioniştilor, nu a putut să demonstreze acest lucru, deşi s-a încercat inclusiv falsificarea unor rezultate experimentale. Campania anti BST a avut efect la populaţie din trei motive:
   a) Era vorba de un hormon de creştere şi hormonii, în mod fals, sunt deja produse apriori condamnate.
   b) Provenea prin tehnologii genetice şi ele apriori condamnate de mulţi politicieni ai lumii, dar şi de consumatori neavizaţi.

Scanned with OKEN Scanner

c) Atitudinea antiprogres şi birocrat-coruptivă a funcţionarilor care nu doreau să-şi strice relaţiile cu puterea politică care-i finanţa preferând introducerea model struţ, a capului în nisip.

2) Al doilea argument al antiloby-ului a încercat să introducă de asemenea un element de sensibilizare a populaţiei, şi anume „Tratamentul cu BST al vacilor de lapte conduce la creşterea infecţiilor ugerului, adică la multiplicarea mastitelor, care, la rândul lor, necesită multiple tratamente cu antibiotice, produse care trec uşor în lapte producând alergii pentru consumatori. În plus, folosirea în cantităţi mari a antibioticelor ar induce rezistenţă la animale, care n-ar mai putea fi tratate cu aceste produse în viitor.

Comitetul de asistenţă în medicină veterinară al FDA, apelând la cercetători consacraţi a putut să demonstreze că îmbolnăvirile de mastită la animale tratate cu BST în nici un caz nu au fost mai frecvente decât la martorii netrataţi.

S-a demonstrat în felul acesta că progresul biotehnologic chiar şi în cele mai pozitive manifestări ale sale poate fi blocat de factori politici, care împreună cu mari companii economice formează grupe de interes de tip monopol pentru care „cercetarea şi tehnologia" - cel puţin pe termen scurt - nu mai înseamnă nimic. Responsabilitatea oficialităţilor în acest caz nu s-a manifestat în nici un fel în apărarea consumatorilor pentru simplul motiv că se decisese astfel din punct de vedere politic. ■

9.4. EXPERIMENTAREA ÎN CÂMP A OMG-URILOR

La început, atât în SUA cât şi în restul lumii a existat cuvântul „NU". Pe toate cererile venite de la mari laboratoare de cercetare sau mari companii interesate în iniţierea în câmp a unor cercetări şi loturi demonstrative, rezoluţia primită a fost NU. Este drept că nu toate cererile erau îndreptăţite, dar în marea lor majoritate erau. Pornind de la ideea că în materie de transformare genetică, ceea ce se realizează în laborator nu poate fi transferat în câmp, NIH-RAC nu a pregătit nici un fel de formulare sau informaţii legate de acest subiect. A fost nevoie de multă muncă pentru ca cercetătorii să convingă funcţionarii publici că la plante, ca de altfel şi la animale, aspectul fenotipic al acestora nu se deosebeşte cu nimic de cele cultivate deja în câmp.

În 1982 NIH-RAC a primit două cereri de efectuare în câmp a unor cercetări cu OMG-uri. Două dintre ele se refereau la plante transgenice - porumb şi tutun. A treia cerere se referea la probarea unei suşe modificate genetic a microorganismului *Pseudomonas syringae*, a cărei funcţie era aceea de a limita pagubele aduse de geruri diferitelor culturi (fenomen atât de întâlnit în ultimul timp în România). Această ultimă cerere a readus în discuţie necesitatea unor reguli, a unor norme legale, care de fapt au şi fost elaborate, privind eliberarea în mediu a unor OMG-uri care ar putea avea efect necunoscut asupra acestuia. ■

Scanned with OKEN Scanner

9.4.1. Povestea lui *Pseudomonas syringae* (bacteria anti-îngheț)

În multe din evenimentele din viața unui individ uman apar probleme aproape incredibile. Logica este uneori lezată. Dacă acest lucru se întâmplă cu subiectivismul unui politician sau al unui funcționar, logica devine neoperantă. Dacă se întâmplă unui foarte riguros cercetător, lezarea logicii creează confuzie și necesită mulți ani de muncă pentru a reveni la normal. De când au apărut antigenele încep să cred în anti-materie ..... Un asemenea lucru pare să se întâmple cu bacteria din povestea noastră.

Forma sălbatică a lui *Pseudomonas syringae* se găsește în natură fiind cantonată, localizată pe suprafața frunzelor plantelor. Pe aceste suprafețe bacteria separă o proteină, pe care o alege din multe altele, proteină care are însușirea ca la temperaturi mici să formeze un „germene" de cristalizare pentru apa de constituție a celulelor care se propagă transformând apa de constituție în cristale, care distrug celulele și provoacă pagube uneori foarte mari culturilor. Cererea solicitată în 1982 către NIH-RAC se referea la experimentarea în câmp, firește în condiții apropiate de îngheț, la începutul înghețului sau la apariția înghețurilor târzii a unei sușe de *Pseudomonas syringae* care conținea o genă indusă prin transformare genetică și care era destinată înlăturării de pe suprafața frunzelor a proteinei care provoca înghețul. Putem spune că se propunea spre omologare **o antigenă** contra înghețurilor târzii adică matematic (-) să se transforme în (+).

Ideea cercetătorilor a fost aceea de a aplica prin stropire sușa bacteriană anti-îngheț, înainte ca forma sălbatică să populeze frunzele. **Bacteriile de gheață**, denumire improprie dată de Bernard R.Coli CK și colab. (1995), pe care noi am înlocuit-o cu bacterii anti-îngheț, prin eliminarea posibilităților de formare a cristalelor de gheață, temperaturile minime de dăunare a culturilor scădeau cu 4-5°, ceea ce e o realizare foarte mare. Acest lucru era cu atât mai mult de apreciat cu cât se știa foarte bine că pagubele aduse de înghețurile târzii culturilor în SUA depășeau anual peste 1 miliard USD. Chiar și în România, în anul 2002-2003 înghețurile de peste iarnă și cele târzii provocau culturilor agricole pagube de aproape 1 miliard USD. Argumentul economic era deci în favoarea omologării acestui valoros procedeu gentehnologic.

După o profundă judecată, atât Ministerul Agriculturii al SUA (USDA) cât și NIH-RAC au aprobat cererea cu decizia, cel puțin a directorului NIH-REC ca proiectul să înceapă chiar din 1983. În aceeași zi însă în care s-a scris DA pe cerere a apărut o contestație din partea unei organizații denumită „Foundation on Economic Trends" (Fundație pentru Orientare Economică) ca și din partea lui Jeremy Rykin, un adversar înrăit al tehnologiilor genetice. Contestația a fost acceptată de judecătorul unui tribunal deși acesta a observat bine că NIH-RAC nu a încălcat nici una din prevederile legale privind toleranța mediului de către bacteria anti-îngheț.

Această decizie a dus la două concluzii și anume:

a) Fie că legislația americană era insuficientă, neacoperind toate problemele privind relațiile dintre OMG-uri și mediu.

Scanned with OKEN Scanner

b) Fie că justiția americană, așa cum se întâmplă frecvent în România, a luat o decizie în afara legii, pe baza unor instincte de moment și sub presiunea mass-mediei.

Judecătorul ar fi trebuit mai degrabă să-și aducă contribuția la îmbunătățirea legilor decât să le calce pe cele existente printr-o decizie în afara legilor.

Urmare a acestei decizii ilegale NIH-RAC și-a reconstituit la rândul sau atitudinea față de OMG-uri solicitând și mai multă documentație ca argumente științifice din care să reiasă că materialul genetic indus din acestea nu se poate transfera în ADN-ul altor organisme. La această decizie și-au adus contribuția și unii critici ai cercetării în câmp a OMG-urilor, care au emis păreri prin care susțineau că organismele modificate genetic, o dată ajunse în mediu reprezintă alte „specii" care ocupă suse ecologice speciale și că pot să aducă mari pagube mediului. În plus s-a întrevăzut posibilitatea ca genele prezente în OMG-uri să fie transferate natural altor organisme care s-ar transforma genetic în organisme necunoscute, care ar putea aduce daune mari ecosistemelor. Deși cred că unele aspecte critice pot fi însușite nu trebuie totul generalizat. OMG-urile monogame, monosexuale, care se înmulțesc cu ajutorul factorilor naturali, vânt, albine etc. și care au echivalenți în flora spontană așa cum este rapița, pot constitui adevărate pericole mai ales pentru OMG-urile din generația I. În acest caz, experiențele fie n-ar trebui aprobate, fie ar trebui efectuate în condiții de maximă izolare pentru ca genele modificate transmisibile prin polen să nu modifice flora sălbatică de rapiță și nici culturile unor producători care nu doresc să lucreze cu OMG-uri. Introducerea noilor tehnici genetice nu trebuie să lezeze drepturile altor producători, și cu atât mai puțin pe cele ale consumatorului.

Începând cu 1986, responsabilitatea pentru emiterea licențelor de efectuare a cercetărilor în câmp a trecut în competența instituțiilor care se ocupă de protecția mediului, mai exact a EPA (US Environmental Protection Agency) și, firește, a USDA.

Rejudecarea cazului *Pseudomonas syringae* a dat dreptul laboratorului producător să efectueze cercetări în câmp în 1987. Rezultatele cercetărilor au dus la concluzia că suşa modificată genetic nu a părăsit zona de experiment și nici nu a supraviețuit durabil în mediu. În schimb, temperatura de rezistență a plantelor a fost redusă cu peste 1°C, suficient de mult, dar mult sub datele obținute în laborator.

În Germania aprobarea pentru efectuarea în câmp a experiențelor cu OMG-uri, atât cât este reglementată problema, intră în responsabilitatea Institutului Robert Koch. Înaintea emiterii licenței de cercetare în câmp, cercetările și evaluarea sunt efectuate de Comisia Centrală pentru Siguranță Biologică (Zentrale Kommision für Biologisch Sicherheit (ZKBS), care recomandă sau nu emiterea licenței. Institutul Robert Koch, înaintea emiterii aprobării apelează, după caz, și la alte instituții cum ar fi, de exemplu „Serviciul Federal pentru Mediu" (Umwelt Bundesamt - UBA). În Germania au fost aprobate numeroase cercetări. În acest moment, la cererea Ministerului Consumatorilor, Alimentației, Agriculturii și Pădurilor, urmare și a intervenției ministrului Kunast, activitatea cu OMG în Germania a fost redusă aproape complet,

Scanned with OKEN Scanner

aspect ce aduce mari deservicii agricultorilor germani. Numai în ultimul timp s-a trecut la înlăturarea treptată şi parţială a acestei carenţe.

Cercetările în câmp cu animale modificate genetic întâmpină atât din partea autorităţilor americane cât şi a celor europene o rezistenţă cu mult mai mare. Instituţiile sunt în acest caz cu mult mai prudente.

Cercetările solicitate pentru comportamentul unor peşti transgenici în condiţii de producţie au fost aprobate numai după ce investitorul în cauză a construit o instalaţie de maximă siguranţă, în care contactul inclusiv cu persoane din afara sistemului era interzis.

Dimpotrivă, pentru plantele modificate genetic, indiferent că modificările implicau îmbunătăţirea calităţii alimentare, sau inducerea unor rezistenţe la insecte, virusuri sau boli, aprobările au necesitat aceeaşi docuemtnaţie şi au fost aprobate cu uşurinţă, indiferent de cultură şi tip de modificare genetică, ceea ce în opinia noastră dovedeşte o anumită slăbiciune în domeniul responsabilităţii instituţionale.

Elaborarea legilor pentru licenţierea OMG-urilor n-a fost deloc o problemă simplă, iar în numeroase ţări ea este de-abia la început, ceea ce a condus, în unele ţări, la folosirea acestora în afara existenţei vreunei legi.

În România OMG-uri la porumb şi soia au fost folosite pe scară largă în producţie, în afara unei legislaţii. Acest lucru a fost posibil ani de zile pentru că nimeni nu s-a preocupat de aceste legi. Companiile şi-au promovat produse modificate genetic pe principiul că „acolo unde un produs nu este interzis, este loc pentru a fi acceptat". A fost o mare greşeală a instituţiilor româneşti, şi astăzi slab reprezentate în acest domeniu.

Astăzi există o lege izvorâtă din necesitatea reglementării utilizării OMG-urilor conform cererilor dosarului de aderare care acceptă atât cercetarea cât şi folosirea în producţie a OMG-urilor la plante, dar numai în ceea ce priveşte rezistenţa la erbicide. Cercetarea românească de specialitate lipseşte, patrimoniul genetic naţional este supus pirateriei şi nimeni nu pare a fi dispus să respecte regulile stricte ale transformărilor genetice ale plantelor, animalelor şi oamenilor.

Legiuitorii români se conformează de regulă principiului lui Solon, legiuitor grec care a trăit în perioada 638 - 559 înainte de Hristos şi care spunea: **„Legile sunt ca o pânză de păianjen, cele mai multe şi neînsemnate sunt reţinute de pânză şi aparţin cetăţii, în timp ce legile importante care reprezintă lucruri deosebite, grele, rup pânza şi se îndepărtează". Un sistem legislativ pânză de păianjen funcţionează acum şi în România, dar nu numai.** Cercetătorii români aşteaptă un alt sistem mai evoluat în care dezvoltarea inovativă valoroasă să nu fie inhibată, să nu fie eliminată ci dimpotrivă acceptată şi implementată.

În cazul OMG-urilor nimeni nu doreşte o tratare superficială a problemei, aşa cum nimeni, dintre aceiaşi cercetători, nu doreşte acceptarea fără discernământ şi investigaţie a tuturor ofertelor de implementare în spaţiul românesc a acestor produse. ■

Scanned with OKEN Scanner

9.5. REGLEMENTĂRI PRIVIND TERAPIA GENETICĂ LA OAMENI

În mai multe capitole ale acestei cărți am discutat în detaliu acest subiect. În câteva fraze dorim însă să sintetizăm și legal această mare problemă contemporană.

Pornim de la ideea, acceptată deja, că genterapia se folosește pentru înlocuirea unor gene defecte ale unui organism uman cu gene funcționale. Aici se diferențiază două situații de acum foarte cunoscute dumneavoastră:

1. Scopul modificării genetice poate fi o celulă a corpului, o celulă somatică și atunci vorbim de terapie genetico-somatică. Prin această strategie „corectura necesară" a defectului genetic rămâne cantonată, limitată la anumite țesuturi sau organe.
2. A doua strategie vizează linia de reproducție umană (sperma sau ovulele, sau tânărul embrion (zigotul)) care și ele, cum am văzut, pot fi modificate genetic, de natură că în celulele în cauză pot fi făcute înlocuiri complete, intacte de gene și nu separații. Această terapie vizează însănătoșirea întregului individ (terapie reproductivă) și, ca urmare, modificările genetice induse individului pot fi transmise și generațiilor viitoare.

Societatea umană, în ansamblul ei, din America și din Europa acceptă terapia genetică somatică ca o modalitate de îmbunătățire a sănătății umane și speră că biologii vor perfecționa acest proiect prin îmbunătățirea performanțelor pe această cale ale corpului și spiritului.

Cea de-a doua strategie, care vizează linia de reproducție, nu a fost și nu va fi acceptată deoarece dezvoltarea procedurii ar conduce implicit la clonarea umană reproductivă pe care nimeni nu o dorește în acest moment.

Referitor la acest aspect, numeroși cercetători sunt de acord că „manipularea eugenică la oameni cu ajutorul procedeelor genetice, este, din punct de vedere tehnic, foarte puțin probabilă iar pentru scopuri medicinale procedeul este tehnic încă nefinalizat". Din 1995 și până astăzi această afirmație a fost depășită și, așa cum am scris mai sus, sunt mulți nebuni care ar dori să-și asigure o viață veșnică folosind exact acest procedeu.

Urmare a rezultatelor obținute până în prezent există un număr mult prea mare de pacienți disponibili să accepte **terapia genetică somatică**, singura care va fi acceptată oficial, cel puțin la nivelul cunoștințelor actuale. Să nu uităm că în 1980 reprezentanții bisericii catolice, protestante ca și ai comunității evreiești au făcut mari presiuni asupra președinției americane, arătându-și îngrijorarea față de manipularea genetică a omului. Comisiile specializate au liniștit lumea religioasă și OMG-urile, anunțând neacceptarea manipulării pe linii reproductive. Totodată au fost convinse toate forțele în dispută despre avantajele neîndoielnice deși incomplete, ale terapiilor genetice somatice.

În 1985, în consecință, NIH a prezentat un document care s-a cerut a fi aprobat de parlament ca lege de bază privind elaborarea și lărgirea procedeelor de aplicare a terapiei genetice somatice. Documentul a detaliat totul și, în primul rând a solicitat ce anume informații trebuie puse la dispoziție de către medic și pacient pentru a se

Scanned with OKEN Scanner

aproba aplicarea terapiei. După aprobarea în congres a unei legi de protejare şi control a terapiilor genetice somatice în viitor, o cerere de tratament trebuie, printre altele, să cuprindă următoarele puncte (după Coli CKR şi colab.)

1. Ce fel de boală trebuie să fie tratată?
2. Cât de gravă este îmbolnăvirea?
3. Dacă există metode alternative, eficiente de tratament.
4. Cât de periculoasă este terapia propusă pentru pacient?
5. Care este eficienţa estimată a tratamentului propus?
6. Care sunt metodele de alegere a pacienţilor?
7. Este procedeul de selecţie corect şi poate livra o mostră reprezentativă? Poate fi el reprezentativ pentru tratamentul propus?
8. Care sunt modalităţile de informare şi clarificare a pacienţilor vizând tratamentul propus?
9. Ce informaţii va trebui să fie primite?
10. În ce formă îşi dă pacientul acordul?
11. Care vor fi măsurile de confidenţialitate atât vizavi de datele pacientului cât şi faţă de procedeul medical practicat şi cum vor fi ele conservate?

Formularele completate vor trebui să facă faţă unor comisii şi subcomisii destul de numeroase, şi anume:

- Human Gene Therapy Subcomitee (Subcomitetul pentru Terapia cu Gene Umane)
- Comisia de etică a institutului NIH
- Comisia tehnică a institutului NIH, care argumentează ştiinţific necesitatea tratamentului.
- Se întruneşte comisia de decizie a NIH şi după judecarea tuturor criteriilor acceptă sau nu cererea.
- Autorul cererii poate face contestaţie, cu care ocazie primeşte noi cereri de completare a documentaţiei.
- Dacă toate cererile şi dorinţele funcţionarilor instituţiei au fost îndeplinite, se recomandă aprobarea tratamentului care este acordată de directorul NIH.
- Cererea o dată aprobată este reanalizată de FDA, care trebuie să-şi dea, de asemenea, acordul.

După cum se vede, o terapie genetică somatică nu este deloc un lucru de rutină, nici un medic din lume neputând să decidă un asemenea tratament.

Pornind atât de la complexitatea tratamentului (uneori acesta este foarte simplu din punct de vedere tehnic), cât şi de la originalitatea, noutatea procedurilor, numărul de examene şi evaluări birocratice, doctorul Leroy Walters, director al Centrului de Bioetică al Universităţii Georgetown, Washington DC, declara: „Eu nu cunosc nici o tehnică sau ştiinţă în biomedicină care să fie examinată atât de detaliat ca terapie genetică la oameni". ■

Scanned with OKEN Scanner

9.6. PE SCURT DESPRE VIITORUL TERAPIEI GENETICE

Este, cu siguranță, argumentat faptul că terapiile genetice la oameni au suportat cele mai mari dezbateri pe care un subiect important le-a solicitat cetățenilor conștienți ai planetei. Puțini politicieni și foarte puțini cetățeni onorabili ai planetei observă că evoluția omului este negativă și că această evoluție va ajunge într-o înfundătură pe măsură ce degenerarea speciei continuă. Imunosistemul uman este de peste 150 de ori mai slab astăzi decât acum 1000 de ani. Ce va urma oare? Mediul și natura de astăzi nu mai sunt aceleași ca acum 1000 sau 10.000 de ani. Dacă ai o problemă existențială, întoarce-te în natură și acolo vei găsi soluția, spuneam într-una articol scris în 2003. Viitorul terapiilor genetice va fi unul pozitiv și promițător, dacă vor fi folosite gene naturale.

Terapia genetică reproductivă la oameni este actualmente **interzisă**. S-a demonstrat însă, recent, că anumite boli cu transmitere ereditară pot fi tratate numai pe această cale. Pe de altă parte, dezvoltările tehnice privind manipularea umană pe căile reproductive au fost blocate (cel puțin oficial). Este deci de presupus că foarte curând terapia genetică pe cale reproductivă va primi lumină verde și va fi acceptată legal. Altminteri, ea va fi practicată la negru, în laboratoare și clinici mai mult sau mai puțin secrete.

O combinație între cele două strategii este de asemenea posibilă. Între timp punctele critice ale acestei terapii sunt intensiv discutate. În scurtă vreme, următoarele probleme vor fi integral rezolvate pentru lansarea acestor terapii. Dacă oamenii, prin drepturile omului, au dreptul la sănătate și există procedee pentru însănătoșirea lor, cine anume își asumă dreptul de a le lua dreptul de a fi sănătoși? Dar despre acest lucru am mai discutat.

În finalul acestei cărți aducem în discuție un articol publicat cu puțină vreme în urmă pe o temă în care tehnologiile genetice sunt profund implicate. Noi considerăm că materialul poate încheia această carte care trebuie să lase loc unor dezbateri ce vor face obiectul altor cărți. ■

Scanned with OKEN Scanner

10. RELAȚIA DINTRE ȘTIINȚĂ ȘI RELIGIE LA ÎNCEPUTUL SECOLULUI XXI

Mărturisesc că atunci când mi s-a solicitat să scriu despre această temă, am avut un moment de teamă, de nesiguranță, considerând subiectul foarte greu abordabil. Experiența mea de cercetător obișnuit cu rigurozitatea cifrelor reieșite din experimente, calcule și logică, a acceptat cu greu ideea aventurării pe un teren nesigur, în care cunoașterea se interferează foarte mult cu necunoașterea, iar dialectica cu metafizica. Din aceste motive, dacă unele abordări par a fi stângace, cer iertare instruitului meu cititor. Sunt totuși un aventurist și nu pot să rezist tentației de a face un exercițiu pe tema enunțată în titlu. ■

10.1. PUȚINĂ ISTORIE

a) Până acum 12.000 de ani umanoizii, adică specia umană, a fost dominant vegetariană, peste 95% din hrană provenind din digerarea plantelor, adică a materiei organice primare obținută din fotosinteză. Acum circa 10.000 de ani a fost consemnată îndeletnicirea oamenilor în a crește animale, iar consumul de carne a crescut de atunci până astăzi de aproape 17 ori pe fiecare individ, solicitând tehnologiilor agricole spargerea barierelor biologice pentru a obține cât mai multă hrană și cât mai mult confort. În Europa zilelor noastre, acest lucru a condus la cea mai mare criză ecologică și la un conflict deschis între oameni și Dumnezeu, ceea ce l-a făcut pe Jacques Chirac să afirme: *„Consumatorii de plante rămân tot consumatori de plante"*. Interpretând această frază, putem spune că Dumnezeu ne-a transmis un semnal. *„După experimentul catastrofal cu boala vacii nebune, se va ajunge să consumăm din nou plante, noi, care altă dată eram consumatori de plante."* Căci știința n-a putut să spună de ce a apărut această boală, ca și cealaltă catastrofă „febra aftoasă", tocmai în Anglia, una din cele mai mari consumatoare de carne...

Acum circa 9000 de ani, adică 7000 de ani înainte de Hristos, oamenii au început să cultive cereale, demonstrând că preocuparea lor de a deveni carnivori a fost mai veche decât dorința de a avea o pâine pe masă.

b) În **1543, Copernic** publică opera sa de referință „De revolutionibus orbium coelestium", prin care demonstrează că în centrul universului se află soarele și nu pământul, așa cum pretindea biserica. A fost prima confruntare majoră dintre știință și religie, care a făcut victime printre savanții vremii căci:

- În **1600, Giordano Bruno** este ars pe rug. Acesta susținuse că universul pare a fi format din planete numeroase provenind din soare, acesta din urmă aflându-se în centrul sistemului planetar. **De remarcat este faptul că Vaticanul nu a reabilitat nici astăzi această ipoteză și nici pe Giordano Bruno.**
- În **1633, Galileo Galilei** este obligat să-și revoce, să-și retragă ipoteza conform căreia soarele se află în centrul universului. Papa Paul al 2-lea explică în 1991 faptul că teologii din vremea respectivă s-ar fi înșelat asupra teoriei expuse.

Scanned with OKEN Scanner

- În **1859, Charles Darwin** își publică lucrarea sa celebră „Originea speciilor prin selecție naturală" punând bazele teoriei evoluționiste și a succesiunii speciilor una din alta pe această cale. Față de această teorie revoluționară pentru științele biologice, biserica nu a avut niciodată o poziție potrivnică. Papa Pius al XXII-lea a declarat în 1950 faptul că „această teorie constituie o ipoteză demnă de luat în seamă".
- În **1865**, călugărul **Georg Mendel**, adică un reprezentant al bisericii, descoperă legile de bază ale eredității în cadrul unor încrucișări între mazăre și fasole. Era pentru prima dată când principiul bisericii medievale „crede și nu cerceta" era încălcat chiar de un reprezentant al bisericii.
- În **1893**, zoologul de origine germană **August Weismann** descoperă faptul că tatăl și mama au o contribuție egală în transmiterea informațiilor ereditare asupra copilului căruia îi dau naștere.
- În **1900**, norvegianul **Hugo de Vries** descoperă mutațiile, fenomene spectaculoase în domeniul eredității și care confirmă teoria evoluției a lui Darwin.
- În **1911, Thomas Hunt Morgan** face experimente pe *Drosofila* demonstrând faptul că cromozomii sunt alcătuiți din gene. Biserica nu a comentat critic aceste experiențe. Ideologia comunistă, mai ales în epoca stalinistă, le-a contestat valoarea, realizările respective nefiind înscrise în manualele de genetică. Același lucru i s-a întâmplat și lui Mendel.
- În **1931**, un alt reprezentant al bisericii, preotul și astrologul de origine belgiană **Georges Lemaître**, își publică în lucrarea „Nature" ideile sale *„despre un atom pozitiv din care și-ar trage originea universul, timpul și materia."* Papa Pius al XII-lea consemnează în anul 1950: *„Acest model reprezintă o confirmare a genezei biblice"*.
- În **1943, Konrad Lorenz** descrie, folosind ca exemplu gâștele sălbatice, *„forma înnăscută a unei posibile experiențe"*, document important pentru bazele genetice ale comportamentului.
- În **1944**, bacteriologul canadian **Oswald Avery** identifică ADN-ul (acidul dezoxiribonucleic) ca pe o substanță chimică a genei, iar fizicianul austriac Erwin Schoerdinger face speculații asupra existenței codului genetic.
- În **1950**, biochimistul **Erwin Chargaff** descoperă faptul că patru comportamente ale ADN-ului se constituie sub formă de perechi.
- În **1951**, chimistul american **Carl Djerassi** descoperă primul produs contraceptiv sub forma unei pastile. Aceste produse sunt respinse și în momentul de față de către Vatican. În ciuda acestei respingeri a bisericii, cei mai mulți credincioși, și mai ales credincioase, folosesc pilule anticoncepționale, demonstrând, în ciuda acestor restricții, că ființa umană preferă interesele personale și confortul, preferă păcatul la alternativele bisericii. Este primul mare conflict între biserică, industrie, economie și societate, conflict departe de a fi rezolvat.

Scanned with OKEN Scanner

– În **1953, James Watson** și **Francis Crick** construiesc primul model spațial al ADN-ului, cunoscut și ca helix dublu (dublu elicoidal).

c) O dată cu anii '70 apar primele rezultate concrete ale realizărilor în domeniul biologiei celulare, respectiv a biotehnologiilor și organismelor modificate genetic. Apare și cel mai mare conflict cu „Dumnezeu" prin reprezentanții Săi – slujitorii bisericii.

– În **1973** se publică primele rezultate asupra modificărilor genetice la bacterii.
– În **1976**, neodarwinistul britanic **Richard Dowkins**, în lucrarea sa „The Selfish Gene" (Gena egocentrică) afirmă că *„singurul element care determină existența unui organism constă în transmiterea de gene".*
– În **1977** apare **prima clonare în care sunt implicate gene umane.** Se vorbește puțin despre acest lucru, dar îngrijorarea crește în rândul înaltelor fețe bisericești, silite să recunoască apropierea savanților de creația de bază a lui Dumnezeu, omul.
– **În 1978 se naște în eprubetă primul copil (Louise Brown).** Crește îngrijorarea moraliștilor și a bisericii. Către sfârșitul anului 1999 Vaticanul a formulat o ipoteză despre „însufletirea neîmpărtășită" .
– În **1983**, americanul **Kary Mullis** pune la punct **„reacția în lanț a procesului de polimerizare"**, o metodologie hotărâtoare pentru descifrarea genomului uman și a fenomenului ereditar.
– În **1986** se lansează la scară largă **mai multe procedee de clonare la animale.** Intră în joc puțin mai târziu și clonarea la maimuțe.
– În **1992 are loc nașterea primului copil în urma unei injectări cu spermă obținută în laborator.** Procedeul a primit denumirea de „Injecție spermicidă intracitoplasmatică". Este pentru prima dată când masculul umanoid este eliminat din fenomenul de reproducție.
– În **1993 cercetători ai Universității americane George Washington fac primele declarații asupra clonării primului embrion uman.** Biserica și politicienii iau foc, iar după 3 zile, acesta a fost distrus. Într-o conferință de presă organizată împreună cu Conferința episcopală a Germaniei, experimentul savanților americani a fost dur criticat de Vatican, fiind considerat drept „un atac nepermis în procesul de creație". Savanților li se puneau astfel cătușe, „un atac nepermis" sugerând că viitoarele cercetări ar avea nevoie de „permisiunea" bisericilor, adică a bunului Dumnezeu.
– **În 1997 s-a născut în Scoția Dolly, celebra oaie clonată** în cel mai mare institut de cercetare genetic al Angliei.
– **În 1998 are loc cultivarea în laborator a primelor celule embrionare umane.** Lucrând în laborator pe viermele cilindric *Coenorhabditis elegantus*, o altă grupă de cercetători pun la punct mecanismul ereditar pe mai multe grupe de celule. Dându-și seama că biserica pierde teren în fața științei, Papa Ioan Paul al II-lea caută un armistițiu între teologie și cercetare, afirmând în cadrul celei

Scanned with OKEN Scanner

de-a 13-a enciclice: „Credința și înțelepciunea reprezintă cele două aripi cu ajutorul cărora spiritul uman se ridică spre recunoaștere și adevăr".

– Anul 2000 a fost plin de **evenimente științifice care au șocat biserica, politicienii, au șocat omenirea. Anglia**, țara cu cele mai grave evenimente ecologice **permite clonarea terapeutică cu celule de bază provenite de la embrioni umani.** Expertul în bioetică al Vaticanului, episcopul Elio Spreccia, face următorul comentariu: *„Nu întrevăd vreo diferență între experiențele cu embrioni clonați și genocidul nepermisibil din vremea lui Hitler."* Germania refuză clonarea terapeutică, dar importă „produsul finit" din Anglia. **Franța permite clonarea dar înjumătățește timpul de viață al embrionilor față de Anglia, adică numai 7 zile.** Între timp, **clonarea umană continuă, tehnica devenind cunoscută în peste 50 de țări ale lumii, fenomenul devenind necontrolabil.**

– **În iunie 2000, Bill Clinton și Tony Blaire anunță descifrarea genomului uman de către Craig Venter și alte echipe americane și japoneze.** Ei consideră acest eveniment științific ca fiind cel mai mare din istoria omenirii. Genomul nu era însă complet descifrat, considerându-se pe atunci că moștenirea ereditară a omului deține peste 140.000 gene. Același **Craig Venter revine în aprilie 2001 și precizează că genomul uman nu depășește 40.000 gene,** fiind aproape identic cu al câinelui și nu departe de cel al râmei. Această precizare incredibilă vine în întâmpinarea teoriei evoluționiste a lui Darwin, conform căreia *„toate ființele vii sunt înrudite unele cu altele"*. Rezultă că evoluția nu este cauzată de numărul de gene ci de calitatea lor, mai exact a proteinelor care le constituie. În același timp, **medicul italian Severino Antinovi și colaboratorii săi,** chiar în nasul Vaticanului, **face cunoscută intenția sa de a clona oameni.** Același lucru este făcut și în America, inclusiv de unele firme aparținând unor secte religioase. Episcopii catolici din Germania mai ales, avertizează asupra faptului că *„omul va fi redus la partea biologică în conformitate cu un cuantum al genelor sale"*. Ei susțin că *„viața este sfântă și sustrasă din disponibilitatea individului"*. Cu alte cuvinte, savanții vor putea crea organisme vii, inclusiv omul, dar nu le vor putea dota cu *„particula sfântă a vieții"*.

  În numeroase țări ale lumii, inclusiv în China și Libia, cercetările continuă și nu se exclude crearea primului om prin clonare, în mai puține 18 luni – competiția este teribilă.

  Ați observat, probabil, că nu am inclus în evenimentele științifice majore legate de subiectul nostru cucerirea spațiului cosmic. Am făcut acest lucru din două motive, și anume:

– Deși a necesitat costuri enorme, cucerirea spațiului cosmic s-a redus la un perimetru apropiat planetei. Sateliții au devenit mijloace de producție și comunicație, obiecte comerciale. Savanții și-au dat seama că explorarea în continuare a macrocosmosului nu este rentabilă.

Scanned with OKEN Scanner

– La întoarcerea sa din cosmos, Juri Gagarin ar fi afirmat că nu s-a întâlnit acolo sus cu Dumnezeu. Biserica nu a reacționat negativ la cucerirea spațiului cosmic, considerând acest lucru ca mult mai puțin periculos decât declanșarea cercetărilor în microcosmosul uman și lansarea tehnologiilor de „creare a omului". Crearea omului este lucrarea lui Dumnezeu și ca atare crearea omului de către om atacă religia în însăși substanța sa. Biserica, credința, rămân deci fără obiectul muncii. ■

10.2. CE SE ÎNTÂMPLĂ CU DUMNEZEU, CU CREDINȚA NOASTRĂ ÎN EL, CU RELIGIA

Citind articolul lui Tom Schimmeck în săptămânalul „Die Woche" din 12 aprilie 2001, mărturisesc că am avut un șoc. Sub titlul „Tehnologia genetică împotriva credinței – Dumnezeu moare" acesta afirmă că *„Omul își alungă Creatorul"* – cercetătorii împreună cu teologii au dispute mari privind religia și teoria cunoașterii. Și, într-adevăr, apar întrebări la care se răspunde foarte greu sau nu se poate răspunde deloc. Conflictul dintre știință și biserică a existat dintotdeauna, dar el s-a acutizat acum când s-au împlinit 2000 de ani de la nașterea Fiului lui Dumnezeu, căci, afirmă Schimmeck, „știința și-a adus o contribuție enormă la evoluția micii noastre lumi, la explicarea fenomenelor apărute, creând transparență în jurul acestora. De la ani lumină străbătuți prin univers până la oferirea celor mai mici detalii despre microcosmos, ea, știința, a depistat ultima vibrație a detunăturii primare, a descompus particulele elementare, a descifrat gene. Și sfârșește prin a se întreba: *„De ce Dumnezeu nu găsește soluții?"* Întrebarea este bună. Antropologii susțin că începând cu omul din Neandertal omenirea a dat naștere la peste 100.000 de religii. Nici una n-a explicat pe ce se bazează existența umană. Religia catolică și ortodoxă, ca și celelalte bazate pe Dumnezeu unic, creator a toate, autorul Genezei și al ființei umane, este în criză, în mare criză, neputând să explice prin reprezentanții Săi de ce omul se creează pe el însuși. Din punct de vedere al bisericii, omul fără a fi divin, este o creație a divinității. Dumnezeu l-a creat pe om așa cum este, virtuos și păcătos, nehotărât și labil, cinstit sau hoț, credincios sau nu. Dumnezeu ar dori să-l păstreze pe om așa cum este, cu nașterea, impozitele și cu moartea lui și cu sufletu-i care să se înalțe la El. Reprezentanții bisericii acceptă chiar și „evoluția speciilor", considerând că aceasta este condusă de Creator. Există mulți teologi care cred și chiar susțin acest lucru; cu atât mai mult cu cât dogmele bisericești, ideologia bisericii nu a cunoscut evoluții de nici un fel în ultimii 2000 de ani.

Ca urmare, o nervozitate generală a cuprins pe teologi și moraliști ca și pe politicieni. Reprezentanții bisericii sunt ironizați chiar și în cele mai credincioase țări ale lumii. Au fost, în multe situații, reluate ironiile lui Friedrich Nitsche pe tema fețelor bisericești spunând: *„Spiritul acestor mântuitori este format din goluri, din găuri, fiecare gol conținând o obsesie, iar ispășitorul acestor goluri, deficiențe, a fost numit Dumnezeu"*. Este foarte adevărat că în decursul istoriei bisericii golurile au început să se umple, iar secretele să iasă la iveală. Biserica s-a împotrivit pe rând ipotezelor lui Galilei, Darwin sau Freud; i-au omorât pe Giordano Bruno și pe mulți „eretici" și

Scanned with OKEN Scanner

„vrăjitori". Şi, cu toate acestea, se pare că ştiinţa a fost întotdeauna mai rapidă. O lungă perioadă de timp biserica a devenit atât de puternică încât s-a suprapus statelor sau a înlocuit instituţiile statale, aruncând asupra Europei primele dictaturi ale istoriei medievale a acesteia. În acele vremuri, biserica a făcut „legea", depăşind preceptele şi poruncile autorului Genezei. Biserica a creat atunci mai mult moarte decât viaţă, lucru consemnat de istorie şi care serveşte ca argument anticriştilor de astăzi. Specialiştii în fizica nucleară, biologii, psihologii şi filozofii nu au încetat să arunce săgeţi după săgeţi în direcţia bisericii. Istoria bisericii corelată cu realizările geneticii contemporane au zguduit serios şi au pus în pericol puternicul edificiu de credinţă.

Aşadar, întrebarea cheie pe care am anunţat-o mai sus şi care flutură pe buzele politicienilor, ale societăţilor civile, este următoarea: ■

10.3. GENETICĂ ÎN LOC DE GENEZĂ ? DUMNEZEU INTRĂ ÎN FALIMENT ?

Cerul nu s-a spart şi nici stelele nu au căzut când prima rachetă cosmică a intrat în „marele spaţiu", dar a căzut în capul reprezentanţilor bisericii şi a conducătorilor ei fideli, atunci când, aproape zilnic apar dovezi că Homo Sapiens devine „Dumnezeul propriei lui imagini". Ştiinţa „creării umane" a avansat atât de mult încât Biologia moleculară a devenit o nouă religie, o concurentă reală a genezei. De ce? Pentru că biotehnologiile au început să producă pe de o parte mai multă sănătate, mai multă viaţă ca intensitate şi durată, şi chiar să-l reproducă pe om în afara spaţiului reproducţiei naturale impus de Dumnezeu. Poate că aici a greşit Dumnezeu, lăsându-i principalei Sale creaturi posibilitatea de a păcătui şi de a alege orice mijloc spre autoperfecţionare, inclusiv subminarea Creatorului „oficial".

Există mulţi critici ai noii bio-ideologii, printre care şi Richard Lewontin, care afirmă despre această nouă doctrină că *„reprezintă o supradimensionare a greşelilor stării genetice a unui organism cu o încărcătură de însuşiri fizice şi psihice predestinate a schimba natura umană a existenţei"*. De zece ani doctrina ADN este un antidot al entuziasmului creat de gene – mai spune savantul de la Universitatea din Harward. În fond, nu poţi să-ţi însuşeşti doctrina ADN ocolind genele, dar Lewontin, exasperat de dimensiunea clonărilor încearcă, fără ca cineva să-l asculte.

Dumnezeu a creat toţi oamenii egali, oferindu-le poruncile şi legităţile Sale. El, Creatorul, le-a oferit viaţa, boala, suferinţa, bucuria şi moartea. Biotehnologiile îi oferă o viaţă fără boli, un chip mai frumos, o inteligenţă mai vie şi o viaţă mai lungă. În fond, oamenii caută de la începutul existenţei lor nemurirea. Or, prin dualismul practicat de biserică, aceasta oferă credincioşilor săi o viaţă fizică „la întâmplare" pe pământ şi o a doua viaţă, veşnică, a sufletului, a spiritului, acolo sus, în ceruri, în rai sau în iad, după modelul comportamental de pe pământ. Modelul oferit de biserică nu mai este acceptat, nu mai este crezut şi, atâta vreme cât oferta bisericii nu schimbă vechile tipare, ea pierde continuu teren. Oamenii sunt buni sau răi, dar toţi vor să-şi trăiască viaţa veşnică aici pe pământ. Or, biserica, neputând oferi un asemenea model, Homo Sapiens se îndreaptă spre biologia celulară care le oferă nu numai viaţa veşnică sau aproape veşnică, dar şi raiul (iarba verde, pomi înfloriţi şi ape limpezi) aici pe

Scanned with OKEN Scanner

pământ şi nu în ceruri, chiar dacă sunt foarte răi, cu condiţia să aibă bani. Şi atunci, dominat de teama de boală, suferinţă şi moarte, slăbiciunea umană ce alege? Este uman să se îndrepte spre noua religie creată de biologia celulară. Oamenii vor putere şi aceasta o pot obţine tot pe această nouă cale. Dumnezeu nu acceptă biodiversitatea în evoluţie, deşi ea se află în natura creată de El, în timp ce biotehnologiile le folosesc în procesul de selecţie şi de creare a omului nou. Avem de-a face cu o nouă eră, denumită bio-eră, pe care foarte mulţi şi-o însuşesc repede. Francis Collins, concurent al lui Craig Venter, cel care conduce proiectul de stat pentru gene în America, sub presiunea politică şi religioasă, devine mai moderat şi afirmă: *„Noi vom vedea noua construcţie umană ca pe o maşină şi nimic mai mult"*. *„În general,* afirmă Collins, *„există o pregnantă tendinţă a omului genezei de a fi tratat ca un mecanism, ca un ansamblu de materiale de construcţii şi sisteme chiar foarte complexe, însă devenit peste noapte în întregime descifrabil, vizibil pentru omul de ştiinţă"*. *„Chiar şi sfârşitul lui"*, susţine cercetătorul în lingvistică Steven Pinker, *„nu ar fi decât o unitate, o rezultantă a lumii fizice, o parte a unui lanţ cauzal de factori fizici"*. El nu vede nici o legătură între microcosmosul decifrat al omului şi Dumnezeu, sau, parafrazându-l pe Gagarin, Dumnezeu nu a fost identificat nici în cosmos şi nici în microcosmos.

De ani buni, filozofii americani desfăşoară o bătălie împotriva existenţei CONŞTIINŢEI UMANE. În fruntea acestora, care consideră omul ca pe o maşină, se situează Daniel Dennet, şi el provenind din lumea bisericii, care consideră că *„tot ce reprezintă raţiune şi sentimente – simţire, în uzina biochimiei om nu este altceva decât un incendiu, o explozie a celulelor nervoase"*, ignorând în întregime existenţa vreunei părticele divine în organismul său. Darwin reprezintă un argument, un Martor care-l susţine în demersul acestuia, cum că în om nu este nimic mistic. În concepţia lui Dennet, o concepţie exclusiv materialistă, evoluţia ar fi numai un algoritm, o *„schemă, un model pentru design-ul omului din haos fără participarea spiritului"*, adică a lui Dumnezeu.

Dennet a găsit sprijin puternic pentru teoria lui în toate branşele, reuşind să inducă noţiuni noi precum „roboţi umanizaţi" sau „maşini spirituale". El mai vorbeşte de *„optimizarea omenirii printr-o evoluţie dirijată"*. Dacă Dennett şi grupul lui are dreptate, ar trebui ca piatra de încercare a omului genezei – conştiinţa sa – să fie distrusă. Se încearcă a se găsi o intersecţie în evoluţie între omul genezei divine şi omul genezei tehnologice (reprogeneză). Deşi drumul este lung pentru materializarea acestei incredibile idei, voinţa este foarte puternică, şi aceasta într-o ţară ca America, considerată a doua credincioasă a lumii după India.

Avem motive deci să revenim asupra întrebării: genetica sau geneza? De ce nu reacţionează Dumnezeu? De ce slujitorii bisericii nu se înarmează cu arme mai convingătoare? Cum se poate apăra religia?

Există ceva ce ar putea salva religia şi pe noi credincioşii lui Dumnezeu? Există acel ceva care este dat, pe de o parte de vârtejul demonic al dialecticii, dar şi de cel al metafizicii. Religia nu poate intra în competiţie directă cu evoluţia recentă, cu ştiinţele naturii, fără riscul de a fi învinsă. Teologii trebuie să exploreze trei lucruri esenţiale şi anume:

Scanned with OKEN Scanner

a) Tărâmul tot mai întins al metafizicii, al non-cunoaşterii, pornindu-se de la ideea că, cu cât cunoaşterea este mai vastă, mai profundă, cu atât mai vaste şi mai profunde sunt şi orizonturile necunoaşterii şi deci a metafizicii. Religia se poate refugia comod în această zonă a metafizicii, reorganizându-şi preceptele şi ideologia la noi niveluri de repliere impuse de descoperirile ştiinţifice.

b) Nu toată societatea umană are acces la „religia biochimiei celulare". Cel mai mare segment al populaţiei lumii, chiar dacă are o anumită informaţie, nu are acces financiar spre tehnologiile „vieţii fără suferinţă şi nelimitată", rămânând ca alternantivă fideli bunului Dumnezeu.

c) Pe de altă parte, mulţi oameni de ştiinţă nu doresc să trăiască atât de singuri, să fie lipsiţi de o fiinţă superioară, de mângâierea mâinii divine. Căci, la urma urmei, oricât de minunată şi puternică este natura ca scop pur independent, ca „artă pentru artă" pur şi simplu, ea apare totuşi incompletă, lipseşte ceva, lipseşte exact sensul, sensul vieţii. Unde este sensul? Cine mai aduce mângâierea? Şi, mai ales, cine menţine valorile morale ridicate în aceste timpuri când Homo Sapiens se autoproclamă Creator?

Aici intervine rolul bisericii, ca tampon între excesele ştiinţei, între agresiunea ei asupra microcosmosului uman şi societatea umană, marele public.

Spre comparaţie, ştiinţa acţionează ca un accelerator de particule, care provoacă atâta energie încât la un moment dat întreaga instalaţie sare în aer. Este nevoie pentru evitarea dezastrului de un proces invers. Evoluţia foarte accelerată a ştiinţei poate face să sară în aer omenirea. Era cât pe ce să se întâmple acest lucru cu energia nucleară. Fenomenul se poate repeta la scară mult mai intensă şi mai perfidă şi cu energiile rezultate din biotehnologii. Amândouă tehnologiile sunt foarte utile societăţii dacă sunt stăpânite şi sunt distrugătoare până la moartea planetei, dacă nu sunt stăpânite. Biserica poate să-şi aroge rolul de calmare a agresiunii ştiinţei, dar nu prin negarea rezultatelor ei, care sunt extrem de concrete şi convingătoare, ci prin descoperirea acelor lacune, goluri pe care ştiinţa le are concret, ca, de altminteri, şi religia. Aceste goluri sunt date acum de lipsa de cunoştinţe privind moştenirea caracterelor ca şi de eficienţa foarte redusă a clonărilor. Ştiinţa a descoperit că există în jur de 40.000 de gene la foarte multe animale şi plante, dar nu a putut să explice care sunt factorii care determină superioritatea omului. Se vorbeşte de faptul că genele omului au o calitate superioară genelor celorlalte vieţuitoare, dar nu s-a obţinut experimental vreo dată concretă. S-a ajuns astfel la milioane de proteine care alcătuiesc comozomii şi genomul. Proteinele sunt necunoscute. Capacitatea tehnică actuală este insuficientă pentru a le putea depista şi recombina în forma lor naturală. Se apelează la natură şi se încearcă a i se copia toate subtilităţile legate de funcţionarea acestora. Are loc un adevărat furt de copyright din natură. Sunt necesare computere mai puternice decât la N.A.S.A. pentru ca în decurs de mai mulţi ani să se poată descoperi ceea ce în natură se produce în câteva secunde. Necunoaşterea proteinelor care generează şi coordonează viaţa este un gol atât de mare încât poate fi comparat cu golurile din „doctrina genezei" şi readuce pe picior de egalitate din multe puncte de vedere ştiinţa şi religia.

Scanned with OKEN Scanner

Marele dezavantaj al religiei prin comparaţie cu ştiinţa este acela că ultima este un valoros mijloc de producţie creator, de profit nemijlocit într-o societate umană profund schizofrenică, în timp ce prima rămâne un consumator nemijlocit. Dar şi aici lucrurile se pot schimba. Slujitorii bisericii părăsesc zidurile catedralelor şi edificiilor de cult şi, pe lângă rolul curativ al credinţei pe care o propăvăduiesc şi a obiectivelor spirituale ce le creează îşi asumă şi rolul de creatori de bunuri materiale, mai ales acolo unde instituţiile statale, prin schizofrenia lor, au distrus inclusiv sistemele de cercetare.

10.4. DESPRE SPIRIT, CONŞTIINŢĂ ŞI EUL INDIVIDULUI

Wolf Singer este membru al Academiei de Ştiinţe Papale din Roma, un organism ce oferă consultanţă Vaticanului în probleme de ştiinţe ale naturii. Este poate omul cel mai indicat pentru o dezbatere pe temele mai sus menţionate. Dezbaterea a avut loc între el şi ziariştii germani în aprilie 2002 şi ne vom folosi, printre altele, de acest experiment important în clarificările noastre.

Cardinalul Ratzinger, un conservator al Vaticanului solicită dimpotrivă lumii ştiinţifice, dacă este în măsură să dea o explicaţie ştiinţifică „SPIRITULUI". Vrem, de la început, să spunem că noţiunea de spirit este diferit descrisă de diferiţi indivizi, în funcţie de gradul de cultură şi înţelegere a ştiinţei, de capacitatea de meditaţie şi sinteză.

Oamenii simpli înţeleg prin spirit „ceva ce supravieţuieşte după moartea noastră" şi îl suprapun noţiunii de conştiinţă. Adică spiritul este acel ceva care ne asigură supravieţuirea „dincolo" şi ar corespunde dualismului lui Descartes privind separarea trupului de suflet.

Mai menţionăm că pe toată perioada dezbaterii pe această temă, W. Singer nu a utilizat nici cuvântul Dumnezeu şi nici pe cel de divinitate deşi era consilier al Papei. El afirma despre spirit în sensul materialist, citãm: *„Atâta vreme cât nu suntem în stare să-l găsim prin metodele noastre experimentale, definirea lui intră sub incidenţa metafizicii."* Dacă spiritul constituie ceva permanent, un lucru nemuritor, ceva ce ne conferă o totală supravieţuire a ceea ce suntem, atunci, această construcţie nu are ce căuta în sistemele descriptive ale naturii. Noi ne străduim să demonstrăm formarea organismelor din celule-ou, ce se transformă ulterior în indivizi cu discernământ şi conştiinţă. Este evident faptul că Singer promovează fără probleme concepţia materialistă a evoluţiei în cadrul sistemelor descripţionale ale ştiinţelor naturii şi că ***„acel ceva ce defineşte personalitatea noastră se va prăbuşi în propriul nostru interior o dată cu moartea noastră."*** Dacă, cu toate acestea, mai rămâne ceva, acest „ceva" nu poate fi considerat ca făcând parte din domeniul sistemelor descriptive ale ştiinţelor naturii. Acest fenomen trebuie crezut ca atare sau, cu alte cuvinte, poate constitui materia primă a doctrinelor bisericeşti.

Încercarea unor teologi de a introduce „spiritul" în modulele de existenţă - logică ale ştiinţelor naturii, chiar în sistemele explicative ale fenomenelor naturale, s-a lovit de un principiu fundamental al lumii vii, şi anume, reproductibilitatea. Prin consecinţă, ştiinţele naturii, biologia, nu se preocupă decât de fenomenele reproductibile. Şi, ca urmare, *„dacă ar exista dovada convingătoare pentru reîncarnare, pentru reveni-*

Scanned with OKEN Scanner

rea spiritului, a sufletului, a conştiinţei, într-un nou organism şi dacă acest fenomen ar apărea în mod frecvent, atunci el ar trebui tratat ca un subiect de experienţă şi meditaţie pentru ştiinţele naturii." Cum asemenea evidenţe nu există până acum (sau n-au fost constatate de ştiinţă), ele trebuie transferate în domeniul metafizicii. O nouă şansă pentru religie, am spune noi.

Cercetătorii, ca şi teologii, nu confundă spiritul cu conştiinţa, deşi pentru amândouă se caută un loc în creierul uman. Dacă ne referim la conştiinţă, cercetătorii afirmă că în creier nu există nici un loc, nici un segment delimitat ca fiind gazdă sau creator de conştiinţă. Conştiinţă în accepţiunea noastră există şi ea ne determină personalitatea. Din aceste motive ştiinţa este confruntată dur cu modul de percepere a formării „eu-lui" interior. Se consideră că la formarea acestuia participă *„procese selectate, structurate şi derulate în paralel, legate între ele într-un mod extrem de miraculos"* (un nou gol al ştiinţei) încât totul să conducă la formarea unui „întreg coerent".

Problema formării „eu-lui" mai trebuie abordată astfel încât pe lângă procesele ce au loc la nivelul creierului să fie studiate şi interacţiunile sociale legate de acestea prin care anumite persoane sau creiere se acceptă sau se resping reciproc. Savanţi biologi au denumit acest lucru DOBÂNDIREA ASUPRA TEORIEI SPIRITULUI.

Există şi o conştiinţă a animalelor care intră evident în contradicţie cu cea umană. Teologii susţin că la om „spiritul" este cel care reglează conştiinţa, spirit care lipseşte la animale. Cercetătorii consideră, dimpotrivă, că saltul calitativ de la animale la om, este dat de complexitatea mărită a creierelor populaţiilor umane care a condus în final la iniţierea şi dezvoltarea discursului interpersonal, intraspecific, care la rândul său a fost indispensabil pentru formarea culturii.

În cadrul evoluţiei culturale devine posibilă transmiterea de experienţe acumulate în timpul vieţii către următoarea generaţie, conservarea şi perpetuarea acestora prin tradiţie. Acest fenomen produce un efect enorm de accelerare a evoluţiei speciei: fiecare generaţie devine capabilă să-şi perfecţioneze arhitectura funcţională a creierelor şi să o transmită, amplificată, generaţiilor următoare, capacitatea de creaţie. Creierele oamenilor zilelor noastre se diferenţiază de cele ale strămoşilor noştri, nu în baza structurii lor genetice (aici modificările, aşa cum s-a văzut, sunt imperceptibile) cât mai degrabă în plan funcţional. Există, la nivelul creierului, procese fine, imperceptibile ştiinţei actuale şi neabordate încă de aceasta, care au creat modificări inexistente în trecut şi care explică permanenta evoluţie pozitivă a inteligenţei, a raţionamentului şi conştiinţei. Nu se întâmplă acest lucru la toţi indivizii umanoizi, ci, cu deosebire la cei ce practică un exerciţiu intelectual intens.

Se poate afirma că toate felurile de cultură, cultură în general, este urmarea unui proces continuu de evoluţie, adică un fenotip al evoluţiei biologiei la om, reconfirmând legile biologiei şi ecologiei asupra competiţiei intraspecifice.

Deşi istoria spune că a existat cândva în evoluţia structurilor complexe biologice o oarecare fază care a facilitat spontan întâlnirea acestora cu forţe de dincolo sau din universul metafizic, acest lucru nu este reconfirmat azi. Este puţin probabil şi nedemonstrat experimental că celulele aflate în stadiul embrionar să conţină deja şi

Scanned with OKEN Scanner

anumite însuşiri precum sensibilitate, conştiinţă sau spirit. Aceste proprietăţi sunt, de asemenea, consecinţa evoluţiei. Scoarţa cerebrală a nou-născutului este crudă şi în nici un caz nu este în măsură să elaboreze concepte abstracte precum vorbirea sau înţelegerea vreunei limbi. Conceptele individuale la fiinţele mici umane se formează în 2-3 ani. Interferarea procesului de maturizare a structurilor celulare cu obţinerea unor performanţe se poate observa cu multă uşurinţă.

În procesul de evoluţie la nivel cerebral, singurul lucru care suferă modificări dramatice este creşterea volumului creierului mare; ceea ce conduce la obţinerea de funcţii suplimentare, la dezvoltarea culturii proprii. La încercarea lui Daniel Dennett de a opune inteligenţei umane una artificială, considerând că aceasta din urmă ar putea obţine şi o conştiinţă, W. Singer îi răspunde: *„O funcţie precum conştiinţa de sine se poate obţine numai în cadrul unui discurs social. Asemenea fiinţe artificiale ar trebui să fie implicate şi în plan social. Ele ar trebui să parcurgă aceleaşi etape educaţionale, ar trebui să cunoască sentimente de afecţiune şi să fie integrate. Ar trebui deci să aibă aceeaşi arhitectură cerebrală ca şi noi. Acestea nu se lasă construite, ci trebuie să se organizeze singure în decursul unui proces de evoluţie foarte complex. Acest proces este atât de complicat încât se propune următorul model: se ia un spermatozoid şi un ovul, se contopesc şi restul este lăsat pe seama naturii!"*

Există oameni de ştiinţă (Legea lui Moor) care afirmă că în anul 2024 capacitatea unui calculator ar putea corespunde creierului uman. Cu acest lucru nu pot fi de acord mulţi biologi şi filozofi ai naţiunii care afirmă că *„Suplimentarea cu tranzistori nu ajută practic la nimic. Sisteme de tipul complexităţii creierului nu pot fi create decât prin evoluţie. Ele nu pot fi construite ca o copie prin cianotopie."*

În argumentele lor, teologii se întreabă firesc *„dacă evoluţia speciilor continuă"*, încotro se îndreaptă specia umană? Este el, omul, capătul, finalul unei evoluţii terestre şi dacă da, cine a condus acest proces?

Aici filozofii naturişti au fost puşi în încurcătură, afirmând că, faţă de această problemă, *„Nu există un răspuns. Dacă într-adevăr omul este rezultatul unui proces evolutiv, aşa cum credem noi, ei bine, atunci cu certitudine nu putem afirma încotro ne îndreptăm"*, spune Singer.

Cine conduce evoluţia? Ei bine, există o mulţime de exemple de procese cu organizare proprie, care produc structuri foarte complexe. În general propria noastră evoluţie este un asemenea proces. Ea porneşte de la nişte instrucţiuni, puţine, ale genomului nostru şi are loc într-o permanentă interacţiune cu mediul înconjurător. Acest model individual de organizare este atât de subtil încât mult timp a funcţionat ipoteza că ar fi dirijat de cineva.

Acum suntem conştienţi că acolo sus nu se află nici un mega-computer care să dirijeze evoluţia macro şi microcosmosului şi nici nu este necesar, căci sistemele cu organizaţie proprie nu necesită cunoştinţe explicite, ele sunt simple.

Poate că Dumnezeu există tocmai în simplitatea funcţionării sistemelor naturale, ascunzându-se în miraculoasele fenomene şi schimbări naturale ce se derulează cu o viteză de cca 10^{6-8} ori mai mare decât actuala capacitate a omului de a le surprinde şi înţelege.

Scanned with OKEN Scanner

De aceea, „necesitatea lăuntrică" după religie rămâne la dispoziția fiecărui om, născut cu un creier în stare să ia decizii, obișnuit să caute relații cauzale sau nu. Dacă creierul nostru nu reușește într-un moment să depisteze relațiile cauzale ale unei anumite stări și să ia măsuri de corecție, atunci este preferabil tratamentul religios. În felul acesta ne întoarcem iarăși la metafizică. Acesta este și spațiul rezervat religiei. Aceasta trebuie să se retragă tot mai mult spre teritorii abstracte, de nepătruns. Atâta vreme cât putem explica anumite fenomene științific, nu le mai putem abandona în mâna divinității. Căci un Univers care se întinde până la infinit, infinitul fiind limita cunoașterii noastre, atrage firesc întrebarea: Ce există în spatele acestei granițe, limite pe care cunoașterea o extinde în permanență? Acolo începe metafizica și acolo se regăsește biserica, spune Singer. Dacă religia continuă să transpună în imagini lucruri ce nu trebuie neapărat crezute, întrucât ele descriu fenomene deja explicate, atunci acest domeniu de existență al religiei va dispărea cu siguranță. Conceptul despre credință trebuie să se plaseze dincolo de granița lucrurilor concrete. Dacă încearcă să persiste în lumea de dincoace, pe imagini și doctrine demonstrate științific. Atunci oamenii vor deveni fie lipsiți de credință, fie puternic dezorientați. Mulți oameni nu vor fi însă în stare să urmeze procesul de raționalizare, de conștientizare a rezultatelor științei. În această situație, logic, ezoterica cucerește teritoriile neocupate. Va fi nevoie de un experiment nou, aproape aventurier, acela de a încerca din nou însuflețirea – animarea unor fenomene deja explicate.

Există, firește, un fenomen anti-rațional, ezoteric, care rezultă din teama socială cum că accelerarea proceselor de cunoaștere, de cercetare ar putea conduce la decăderea umanității. Cu toate acestea, știința nu trebuie privită ca un atac asupra omenirii și cu atât mai puțin asupra lui Dumnezeu, a credinței și religiei. Nu se poate nega însă faptul că *„Atunci când cerul se curăță în gol de divinități cârmuitoare, sentimentul de inutilitate în a mai crede se extinde cu rapiditate"*. Oamenii au însă nevoie de o religie și trebuie să li se ofere una modernă. Dacă științele naturii contribuie nemijlocit la dezvoltarea progresului, religia nu trebuie să acționeze invers. Substanța religiilor nu trebuie să constituie produsul distilării unor experimente colective ci, dimpotrivă, o religie nouă trebuie să aducă argumente noi pentru credință, ea trebuie să-și schimbe înfățișarea pentru a-și menține valoarea.

Religia trebuie să se dezvolte și, în viitor, în paralel cu științele, în caz contrar ea riscă să devină neverosimilă. Religia nu poate bloca evoluția, dezvoltarea prin știință și nici nu trebuie să o facă. Cele două instituții ale umanității pot deveni complementare și poate chiar sinergice în dezvoltarea binelui general.

Filozoful în științe Gregory Stock spune: *„Multe sunt domeniile în care credem că îl putem substitui pe Dumnezeu și acum nu mai putem da înapoi." „Dacă suntem în stare să creăm oameni mai buni, datorită faptului că știm cum să implementăm gene, de ce nu o facem? Cine ne interzice aceasta?"* se întreabă părintele tehnologiei genetice și deținătorul premiului Nobel, James Watson. Chiar așa ne întrebăm și noi, de ce n-o facem? Condiția e pusă și anume să creăm oameni mai buni, nu? Iar pentru acest lucru ar putea sta garanție biserica și chiar politicienii, instituțiile statului. Această interpretare este una de forță. Slujbașii bisericii trebuie să abandoneze comoditatea

Scanned with OKEN Scanner

în a neglija problemele esenţiale ale omenirii şi trebuie să creeze acea religie modernă care vine în întâmpinarea credincioşilor. Ei trebuie să sprijine crearea unui om mai bun, ca fiind făcută cu ajutorul lui Dumnezeu, dar trebuie să se opună folosirii tehnologiilor de a evolua strâmb, adică inclusiv pentru crearea de oameni răi, potrivnici dezvoltării normale a societăţii, potrivnici progresului tehnic şi social, dictatori sau monştri politici şi sociali.

Papa Ioan Paul al II-lea a înţeles bine dificultăţile prin care trece biserica în general şi credinţa în Dumnezeu în special. El s-a luptat pentru unirea bisericii catolice cu cea ortodoxă. Dacă acest lucru se va întâmpla, posibilitatea de a reaprinde credinţa în Dumnezeu devine foarte mare. Chiar şi fără unirea bisericilor credinţa nu va dispărea. Va apărea însă pregnant îndoiala, semn al erodării credinţei în Dumnezeu.

Omenirea şi-a distrus practic natura care i-a dat naştere şi, firește, greşeli nu prea mari ar putea să o conducă repede la pieirea ei. Poate că Dumnezeu Îşi va arăta atunci puterea, încercând prin Fiul Său Hristos, sau poate prin alt reprezentant al Său, să mai salveze o dată omenirea. Cât despre politicieni, de la ei nu ne putem aştepta la nimic bun. O schizofrenie generală a cuprins, aşa cum spuneam, omenirea, iar România se află în fruntea ţărilor care au acceptat subdezvoltarea ca politică de stat. Ne aducem aminte de filozoful francez B. Labour care spunea: *„Pentru politicieni nici un experiment şi nici o religie nu sunt bune dacă nu vin în interesul lor personal"*. Şi cât adevăr este în aceste ziceri. Recent, preşedintele Americii G.W. Bush nu a semnat protocolul de la Koyota privind protecţia atmosferei dând câştig de cauză celor 233 firme puternic poluatoare reunite în grupul G.C.C., cel care l-a sprijinit în alegeri, firme care lansează spre ceruri, adică chiar în nasul bunului Dumnezeu, 25% din emisiile poluante ale industriei Terrei. Şi aceasta în ciuda celor peste 1600 savanţi de prestigiu ai lumii care au descris ştiinţific pericolul dezastrului.

Fără îndoială că omenirea se află la răscruce, iar credinţa în bunul Dumnezeu ne poate aduce mântuire. Căci chiar şi cei mai înrăiţi biotehnicieni materialişti, atunci când au descifrat genomul, au exclamat: *„Îţi mulţumesc Ţie, Doamne, că m-ai ajutat să realizez această minune."* Era o recunoaştere a faptului că minunile ştiinţei umane s-au împlinit cu ajutor, fie şi ipotetic, al lui Dumnezeu. Este un lucru care merită consemnat. Da, trebuie consemnat acest fapt pentru că aici cred că e marele adevăr. **Dumnezeu dacă stă în spatele tuturor lucrurilor şi fenomenelor, stă cu siguranţă şi în spatele ştiinţei, inclusiv a biologiei celulare. Oamenii pot să se autoconstruiască. Copia nu va fi niciodată identică cu originalul. Va semăna, poate va fi o copie chiar mai bună, dar nu va avea valoarea originalului.** Bunul Dumnezeu aruncă omenirii o nouă provocare. Vom vedea reacţia oamenilor şi a reprezentanţilor pe pământ ai Creatorului. De aceea, afirmaţia lui Malreaux cum că *„secolul XXI va religios sau nu va fi deloc"* este o dilemă care va fi rezolvată cu întârziere, probabil nu mai devreme de trecerea primilor 20 de ani ai acestui secol şi mileniu. De această decizie a omenirii depinde în procent de peste 80% şi decizia bunului Dumnezeu de a pedepsi cu dispariţia omenirea, sau, dimpotrivă, de a o salva. Şi cel mai posibil, Dumnezeu va acţiona prin reprezentantul de bază al genezei Sale, al evoluţiei naţiunii create de El – Homo Sapiens.

Scanned with OKEN Scanner

BIOTEHNOLOGII GENETICE

GLOSAR

A

ADENOVIRUSURI - tip de virusuri cu genom ADN întâlnite la rozătoare, păsări, animale şi om. La om produc infecţii acute ale tractului respirator fiind asemănătoare cu cele ale unei răceli obişnuite. Sunt implicaţi şi în formarea tumorilor (→oncogen).

ADN - acid dezoxiribonucleic, materialul genetic al celor mai multe celule vii, este principalul constituent al cromozomilor din nucleul celulei şi joacă un rol esenţial în determinarea caracterelor ereditare, controlând sinteza proteinelor din celule (→ cod genetic). Pe lângă nucleu, mai este prezent şi în alte organite celulare, cum ar fi mitocondriile (→gene extranucleare - ADN mitocondrial). ADN este un acid nucleic alcătuit din două lanţuri de nucleotide, în care zaharidul este dezoxiriboza, iar bazele azotate sunt adenina, citozina, guanina şi timina. Cele două lanţuri sunt răsucite unul în jurul celuilalt şi sunt legate între ele prin punţi de hidrogen stabilite între bazele azotate complementare (→ împerecherea bazelor azotate) formând o moleculă în spirală (dublu helix).

ALELĂ - una din cele două sau mai multe forme alternative ale unei gene într-un locus dat pe cromozom, apărute ca urmare a diferenţelor din molecula de ADN. Ochii albaştri sau căprui la oameni sunt determinaţi de diferite alele ale genei pentru culoarea ochilor. Organismele cu două seturi de cromozomi (diploide) vor avea două copii pentru fiecare genă. Dacă ambele alele sunt identice, individul se numeşte homozigot pentru acel locus, dacă sunt diferite, individul este heterozigot.

AMILOPLAST; AMILOPLASTIDE - Amiloplast, organit întâlnit la plante, în care se depozitează amidon. Adesea, amiloplastele se află în ţesuturi care nu au rol fotosintetizator.

AMOEBA - gen de protozoare din filumul „Rizopoda". Organismele din acest gen emit prelungiri protoplasmatice temporare numite pseudopode, folosite pentru locomoţie şi nutriţie. Datorită acestui fapt forma celulei se modifică necontenit (→ mişcare amiboidală). Majoritatea speciilor trăiesc în sol, nămol sau apă, hrănindu-se cu protozoare mai mici sau cu alte organisme unicelulare. Există şi unele specii parazite (*Amoeba proteus*).

AMPRENTARE GENETICĂ (AMPRENTARE ADN) - tehnică de analiză a ADN-ului unui individ în vederea stabilirii modelului de repetiţie a numitor secvenţe de nucleotide (secvenţe marker) în cadrul genomului. Se consideră că acest model îi este unic individului respectiv, tehnica fiind utilizată pentru identificarea indivizilor şi pentru stabilirea paternităţii şi, de asemenea în medicina veterinară. Cantităţi suficiente de ADN pot fi obţinute din mostre foarte mici de ţesuturi (de exemplu sânge, spermă

Scanned with OKEN Scanner

sau păr). Se utilizează enzime de restricţie pentru a rupe ADN-ul, iar secvenţele marker sunt identificate cu ajutorul probelor de gene şi prin southern blotting.

ANABOLISM - latură a metabolismului ce constă în sinteza de proteine, lipide şi alţi constituenţi ai organismelor vii, pornind de la molecule sau de la precursori mai simpli. Acest proces necesită energie sub formă de ATP→metabolism. (Compară cu catabolism).

ANAFAZĂ - una dintre fazele diviziunii celulare. În mitoză, cromatidele fiecărui cromozom se separă şi se deplasează în direcţii opuse, îndepărtându-se fiecare spre câte un pol al fusului de diviziune. În anafaza I a meteozei perechile de cromozomi omologi se separă şi fiecare cromozom se deplasează spre unul din cei doi poli opuşi ai celulei; în anafaza II are loc separarea cromatidelor, ca şi în cazul mitozei.

ANTICODON - secvenţă de trei nucleotide din molecula de ARN de transfer care în timpul translaţiei se uneşte pe principiul complementarităţii (împerecherea bazelor azotate) cu o secvenţă trinucleotidică specifică (codon) din molecula de ARN mesager → sinteza proteinelor.

ANTIGEN - substanţa pe care organismul o consideră străină, declanşând din această cauză un răspuns imun. Antigenele pot să se formeze în interiorul organismului sau pot proveni din exterior. De obicei au structură proteică. Antigenele de histocompatibilitate sunt prezente în ţesuturi, fiind implicate în respingerea grefelor de ţesuturi sau de organe. Grefa va fi respinsă în cazul în care organismul primitorului (acceptorului) consideră antigenele din ţesuturile donatorului ca fiind străine.

APARATUL GOLGI - ansamblu alcătuit din vezicule şi membrane pliate, prezent în citoplasma celulelor vegetale şi animale, care depozitează şi transportă produşii de secreţie (cum ar fi enzimele şi hormonii şi intervine în formarea peretelui celular (atunci când acesta este prezent). A primit numele citologului italian care l-a descoperit (Camillo Golgi, 1843-1926).

APOPTOZA - moarte a celulelor survenită în cursul proceselor normale de dezvoltare, menţinere şi reînnoire a ţesuturilor din organism. În cursul dezvoltării embrionare apoptoza are un rol esenţial în determinarea dimensiunilor şi formei finale a ţesuturilor şi organelor. Apariţia cancerului este asociată cu inhibarea apoptozei (→ factori de creştere), fenomen care are loc atunci când celulele sunt infectate cu un virus, pentru a bloca activitatea celulelor killer. Apoptoza nu trebuie confundată cu necroza în cazul căreia moartea celulelor poate fi provocată de o substanţă toxică.

ARN (abreviere de la acidul ribonucleic) - acid implicat în procesul de translare a → ADN-ului, adică a materialului genetic în proteine. Este, de obicei, monocatenar, spre deosebire de ADN care este dublu catenar şi constă dintr-un mare număr de nucleotide legate între ele, fiecare fiind formată dintr-un rest de riboză, o grupare fosfat şi una din cele patru baze azotate (uracil, citozina, adenina şi guanina).

Scanned with OKEN Scanner

ARN-ul este copiat de pe o moleculă de ADN prin formarea → perechilor de baze, uracilul luând aici locul timinei din ADN.

ASTROCITE → NEVROGLII

ATP (abrevierea pentru adenozin trifosfat) - nucleotid prezent în toate celulele. El este utilizat ca purtător de energie, eliberând mari cantităţi de energie pentru numeroasele procese biologice ce întreţin viaţa, creşterea, mişcarea şi reproducerea. ATP este forţa conducătoare din spatele contracţiei musculare şi sintezei complexelor moleculare necesare fiecărei celule. Plantele verzi folosesc energia solară pentru a produce ATP ca parte a procesului de → fotosinteză.

AUTOZOM - orice cromozom din celulă, altul decât cromozomul de sex. Autozomii sunt identici ca număr şi tip atât la mascul cât şi la femelă pentru o specie dată.

B

BACTERIOFAG (fag) - virus parazit la o bacterie. Fiecare fag este specific pentru un anumit tip de bacterie. Cei mai mulţi (fagii virulenţi) infectează o celulă, se multiplică rapid în interiorul ei şi apoi îşi distrug gazda (liza celulei bacteriene). Există şi o altă categorie de fagi (fagi temperaţi) care, după ce infectează o celulă rămân în stare latentă în interiorul gazdei; genomul lor se integrează în cel al gazdei şi se replică o dată cu acesta, infectând celulele-fiice (→lizogenie).

BANCĂ DE GENE - colecţie de fragmente de ADN clonate, reprezentând întregul material genetic al unui organism. Facilitează localizarea şi izolarea genelor. Băncile de gene sunt alcătuite prin fragmentarea ADN-ului genomic cu ajutorul enzimelor de restricţie şi/sau metodelor fizice. Fragmentele obţinute sunt clonate (→clonare genetică), iar celulele gazdă în care sunt introduse fragmentele sunt centrifugate şi îngheţate; o variantă a acestei metode este menţinerea vectorilor fagi în cultură. Genele pot fi identificate cu ajutorul probelor de gene în cadrul tehnicii numite Southern Blotting sau prin intermediul produşilor proteici sintetizaţi pe baza lor, în tehnica denumită Western Blotting. Astfel, băncile de gene reprezintă depozite de materie primă ce poate fi utilizată în ingineria genetică. La om, o bancă de gene poate conţine până la 500.000 clone diferite.

BIOCHIMIE - ramură a chimiei care se ocupă cu studiul organismelor vii, analizând în special structura şi funcţiile substanţelor chimice care le alcătuiesc (în principal proteine, glucide, lipide şi acizi nucleici). Biochimia reprezintă o componentă importantă în multe alte discipline, mai ales în fiziologie, genetică şi în cercetările asupra nutriţiei, iar descoperirile din acest domeniu au o influenţă puternică în medicină, agricultură etc.

BIOGAZ - amestec de metan şi dioxid de carbon, rezultat din descompunerea anaerobă a unor reziduuri cum ar fi apele uzate menajere, industriale şi a celor provenite din agricultură. Descompunerea este realizată de bacterii metanogene (bacterii obligat

Scanned with OKEN Scanner

anaerobe producătoare de metan). Metanul, principalul constituent al biogazului poate fi extras şi folosit ca sursă de energie.

BIOLOGIE MOLECULARĂ - disciplina care studiază structura şi funcţiile moleculelor mari ce intră în alcătuirea fiinţelor vii, în special proteinele şi acizii nucleici ADN şi ARN.

BIOTEHNOLOGIE - dezvoltarea unei tehnici de aplicare a proceselor biologice în scopul obţinerii unor substanţe necesare în medicină, industrie, agricultură. De exemplu, fabricarea antibioticelor, a brânzeturilor, vinurilor se bazează pe activitatea unor fungi sau a unor bacterii. Prin inginerie genetică se pot obţine celule bacteriene modificate, capabile să sintetizeze substanţe complet noi (de exemplu hormoni, vaccinuri, anticorpi monoclonaţi etc.).

BRASINOSTEROIZI - O generaţie relativ nouă de produse (grupe) chimice care pot contribui la fortificarea culturilor şi a inducerii rezistenţei la boli şi dăunători şi a toleranţei la stresurile biotice şi abiotice (frig, căldură, secetă). Această nouă grupă chimică ar putea fi o variantă evoluată a generaţiilor de regulatori de creştere sintetizaţi şi utilizaţi în scopul reglării metabolismului plantelor. Pentru tratamente se utilizează doze foarte mici (de 1 mg/l) pe fond de siguranţă maximă a mediului, precum şi posibilitatea reducerii dozelor de pesticide şi a numărului de tratamente cu efecte importante pentru mediu şi calitatea recoltelor.

C

CAPSIDĂ - învelişul de natură proteică al particulelor virale (→virus), alcătuit din unităţi numite capsomere. Natura chimică a capsidei are un rol important în decanşarea răspunsului imun al organismului împotriva virusului.

CAPSOMER - unitate proteică ce stă la baza alcătuirii învelişului extern (capsidă) cu structura regulată, al particulelor virale. La majoritatea virusurilor în alcătuirea capsidei intră mai multe tipuri de proteine.

CATABOLISM - latură a metabolismului care constă în scindarea moleculelor mari, în molecule mai mici, concomitent cu o eliberare de energie. De exemplu, respiraţia reprezintă o suită de reacţii catabolice.

CENTRIOL - structură cilindrică implicată în diviziunea celulară. În mod obişnuit lipseşte din celulele vegetale dar este prezent în majoritatea celulelor animale (→centrozom). În decursul diviziunii celulei se deplasează spre capetele opuse ale nucleului, formând polii de diviziune, din care pornesc fibrele fusului de diviziune.

CENTROMER (kinomer) - parte a cromozomului prin care acesta se leagă de fibrele fusului de diviziune în cursul procesului de diviziune celulară (→ meioză, mitoză). Poziţia centromerului este un caracter distinctiv. Cromozomii care au centromerul situat în centru sunt numiţi metacentrici, cei cu centromerul situat în apropierea unuia

Scanned with OKEN Scanner

din capete sunt acrocentrici, iar cei care au centromerul la unul din capete sunt telocentrici.

CENTROZOM (centru celular, centrosferă) - regiune specializată a celulei situată în imediata apropiere a nucleului, în care se formează şi se distrug microtubulii în cursul diviziunii celulare.

CICLUL GLIOXILATULUI - cale metabolică întâlnită la plante şi la microrganisme, care reprezintă o variantă modificată a ciclului Kreps. Utilizează grăsimile ca sursă de carbon şi permite sintetizarea glucidelor din acizii graşi, evitând etapele ciclului Krebs în cursul cărora este eliberat dioxid de carbon. Se desfăşoară în ţesuturile bogate în grăsimi, ca de exemplu cele ale seminţelor în curs de germinare. Enzimele care catalizează reacţiile acestei căi metabolice nu au fost descoperite la mamifere; sunt conţinute în organite speciale numite glicozomi.

CICLUL KREBS (ciclul acidului citric, ciclul acizilor tricarboxilici, ciclul ATC) - serie ciclică de reacţii biochimice, fundamentală pentru metabolismul organismelor aerobe (animale, plante şi mare parte din microorganisme). Enzimele ciclului Krebs sunt localizate în mitocondrii şi sunt în strânsă asociaţie cu componentele lanţului de transport al electronilor. Ciclul Krebs este punctul principal de „inserţie" în sistemul complex de căi metabolice şi este implicat nu numai în catabolizare şi în producerea de energie ci şi în sinteza biomoleculelor.

CITOCROMI - grup de proteine ce conţin în structura lor o grupare hem, având rolul de transportori de electroni în mitocondrii şi cloroplaste. Transferul electronilor se datorează modificărilor reversibile pe care le suferă atomul de fier al grupării hem, care trece din starea redusă Fe (II) în cea oxidată, Fe (III).

CITOKINA - factor solubil secretat de celulele sistemului limfoid, având rol de semnal pentru alte celule limfoide. Există două categorii de citokine: limfokinele, secretate de limfocite şi monokinele, secretate de macrofage. O parte dintre citokine, în special interferonii şi interleukinele sunt produse atât de limfocite cât şi de macrofage.

CITOKINEZA - ciclul celular; diviziune celulară.

CITOPLASMA - substanţa gelatinoasă care înconjoară nucleul celulei. Este alcătuită dintr-o matrice în care se află în suspensie organitele celulare. În cadrul ei se individualizează ectoplasma densă, aflată în exterior şi implicată îndeosebi în mişcările celulare şi endoplasma, mai puţin densă, care conţine majoritatea structurilor celulare.

CITOSCHELET - reţea de fibre care străbate matricea celulelor vii, alcătuind un suport pentru organite; ancorează membrana celulară, facilitează mişcările celulare şi creează o suprafaţă adecvată pentru desfăşurarea reacţiilor chimice. Fibrele sunt reprezentate de microtubuli şi microfilamente de actină.

Scanned with OKEN Scanner

CITOSOL - partea solubilă, semilichidă a citoplasmei celulelor care conține microfilamentele citoscheletului. Organitele celulare se află în suspensie în citosol.

CLONA - grup de organisme sau celule provenite dintr-un singur individ prin reproducere asexuată, fiind de aceea identici din punct de vedere genetic. De exemplu, plantele care se înmulțesc prin bulbi sau butași.

CLONARE GENETICĂ (clonare ADN) - producerea de copii exacte (clone) ale unuia sau a unor anumite gene cu ajutorul tehnicilor de inginerie genetică. ADN-ul care conține gena (genele) urmărită este fragmentat cu ajutorul enzimelor de reacție. Fragmentele rezultate sunt incluse în vectori de clonare, cum ar fi de exemplu plasmidele bacteriene sau bacteriofagii, care transferă ADN-ul recombinat în celule gazdă corespunzătoare. În interiorul celulei gazdă, ADN-ul recombinat este replicat, din celula gazdă bacteriană rezultând o colonie de celule care conțin gena clonată.

CLOROPLAST - organit (→ plastid) care conține clorofila, aflat în mari cantități în celulele fotosintetizatoare ale algelor și plantelor superioare.

COD GENETIC - sistemul prin intermediul căruia informația genetică din ADN controlează producerea diferitelor proteine din celulă. Acesta se prezintă sub forma unei serii de triplete de nucleotide din structura ADN pe baza cărora este transcrisă o secvență complementară din codoni în ARN-ul mesager (transcripție). Secvența de codoni din ARNm condiționează secvența aminoacizilor în timpul sintezei proteinelor. Există 64 de codoni, rezultați prin combinarea celor patru baze prezente în ADN și în ARNm în timp ce aminoacizii care intră în alcătuirea proteinelor sunt în număr de 20; unii aminoacizi sunt codificați de mai mulți codoni, iar unii codoni au alte funcții.

CODON - triplet de nucleotide din molecula de ARN mesager care codifică un anumit aminoacid în cursul sintezei proteinelor (cod genetic); reprezintă unitatea funcțională a codului genetic.

CONJUGARE - (1) Fuziunea a două celule reproducătoare; termenul este utilizat îndeosebi atunci când cele două celule sunt de dimensiuni egale (→izogamie). (2) Tip de reproducere sexuată la unele alge (de exemplu *Spirogyra*), unele bacterii (de exemplu *Escherichia coli*) și protozoare ciliate.

CROMATIDA - structură foliformă care devine vizibilă în stadiile timpurii ale diviziunii celulare, reprezentând un cromozom. Fiecare cromozom se divide longitudinal, rezultând două cromatide, unite într-un singur loc numit centromer. În stadiile târzii, cromatidele se separă complet. Replicarea ADN-ului din care este alcătuit cromozomul este foarte exactă, astfel încât fiecare cromatidă are aceeași cantitate de ADN ca și cromozomul original din care s-a format și devine un cromozom fin cu exact aceleași gene.

CROMATINA - substanță din care sunt compuși cromozomii eucariotelor. Este alcătuită din proteine (în principal histone), ADN și mici cantități de ARN (→ nucleosom).

Scanned with OKEN Scanner

În nucleii inactivi metabolic, o mare parte a cromatinei se prezintă în formă condensată, numită heterocromatină, în nucleii activi însă cea mai mare parte a cromatinei se prezintă sub formă relaxată, numită eucromatină. Numai informația genetică din regiunile eucromatinice poate fi copiată în ARN mesager.

CROMOZOM - formațiune filiformă prezentă în mai multe exemplare în nucleul celulelor vegetale și animale (eucariote). Cromozomii sunt alcătuiți din cromatină și poartă genele dispuse într-o succesiune liniară în lungul cromozomului; acestea determină caracterele individuale ale unui organism. Fiecare cromozom este alcătuit din două cromatide reunite între ele în regiunea centromerului (→ meioză; mitoză). Numărul de cromozomi din celule este constant la toți indivizii care aparțin aceleiași specii, fiind caracteristic pentru specia respectivă.

CROSSING OVER (încrucișare în limba engleză) - schimb reciproc de segmente cromatidice între cromozomii omologi.

D

DELEȚIE - (1) Mutație punctiformă ce constă în pierderea uneia sau mai multor perechi de baze din secvența ADN. (2) Mutație cromozomială, adeseori letală, rezultată în urma apariției unui crossing over inegal în meioză astfel încât una dintre cromatide pierde mai multă informație genetică decât primește.

DESMOZOM - bandă de material care leagă celulele adiacente între ele, permițând grupurilor de celule să funcționeze ca o unitate. Desmozomii reprezintă unul dintre tipurile de joncțiuni intercelulare (compară cu joncțiunea de tip gap).

DIPLOID - termen ce descrie o celulă, un nucleu sau un organism care are un număr dublu de cromozomi față de numărul haploid caracteristic speciei respective. Numărul diploid este simbolizat 2n. Cele două seturi de cromozomi prezente provin unul de la mamă, iar celălalt de la tată. La animale toate celulele somatice sunt diploide, celulele reproducătoare fiind singurele al căror număr de cromozomi e redus la jumătate.

E

ECTOPLASMA - vezi CITOPLASMA.

ELECTROFOREZA (catoforeză) - tehnică utilizată pentru analiza și epararea coloizilor, bazată pe micșarea parituculelor coiloidale încărcate electric în câmp electric. Electroforeza este larg utilizată în studiul amestecurilor de proteine, acizi nucleici, glucide, enzime, etc. În medicină este folosită pentru a măsura conținutul proteic al fluidelor corporale.

ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDA - tip de electroforeza utilizat pentru a determina dimensiunile și compoziția proteinelor.

Scanned with OKEN Scanner

ENDONUCLEAZA - enzima care catalizează hidroliza legăturilor din interiorul moleculelor de acizi nucleici → enzimă de restricţie.

ENZIMA DE RESTRICŢIE (endonucleză de restricţie), tip de enzimă capabilă să scindeze moleculele de ADN străin în anumite situsuri particulare. Enzimele de restricţie sunt produse de unele bacterii şi protejează celulele acestora scindând (şi deci distrugând) ADN-ul virusurilor invadatoare. Celulele invadatoare sunt protejate de propriile lor enzime de restricţie prin modificarea bazelor ADN în timpul replicării. Enzimele de restricţie sunt utilizate pe scară largă în tehnicile de inginerie genetică.

ELONGAŢIE - (alungire) (în sinteza proteinelor), etapă a sintezei proteice în care aminocizii se leagă rând pe rând între ei prin legături peptidice pentru a forma un lanţ polipeptidic (translaţie). Factorii de elongaţie (alungire) sunt molecule proteice care se leagă în complexul ARNt-aminoacid şi permit poziţionarea corectă a acestui complex de ribozom, astfel încât să se poată desfăşura translaţia.

ENDOCITOZA - proces prin care substanţele pătrund în celulă fără să străbată membrana celulară. Membrana plasmatică se învaginează în jurul particulei aflată în afara celulei, formând o veziculă saciformă în care este încorporată particula respectivă. Apoi particula se desprinde de suprafaţa celulei, ajungând în interior (→ endozom). Există două categorii de endocitoză: fagocitoză şi pinocitoză.

ENDOPLASMĂ - vezi CITOPLASMA.

ENZIMĂ - proteină care îndeplineşte rolul de catalizator în reacţiile biochimice. Fiecare enzimă prezintă specificitate pentru o anumită reacţie sau grup de reacţii asemănătoare. Multe enzime trebuie să se asocieze cu anumiţi cofactori neproteici pentru a putea funcţiona. Activitatea enzimelor este influenţată de concentraţia substratului, de temperatură şi pH. Sinteza enzimelor este controlată genetic.

EPISOM - element genetic care poate să existe şi să se replice fie independent de cromozomii celulei gazdă, fie ca parte integrantă a acestora. Aşa sunt, de exemplu, unele plasmide bacteriene.

EREDITATE - transmitere a caracterelor de la părinţi la descendenţi prin intermediul cromozomilor. Studierea eredităţii (genetică) a fost iniţiată de Gregor Mendel, care a indetificat o serie de legi ce guvernează ereditatea (legile lui Mendel).

EUCARIOT - organism format din celule care posedă un nucleu distinct, care conţine materialul genetic. În afară de bacterii, toate organismele sunt eucariote.

EXOCITOZĂ - proces prin care substanţele sunt eliminate din celulă prin intermediul veziculelor ataşate de membrană. Membrana veziculelor fuzionează cu membrana plasmatică descărcând la exterior conţinutul veziculei.

EXON - secvenţă de nucleotide dintr-o genă care codifică o parte sau chiar întregul produs al acelei gene sau exercită o funcţie de control.

Scanned with OKEN Scanner

EXONUCLEAZĂ - enzimă care catalizează hidroliza nucleotidelor de la capetele moleculelor de acizi nucleici (compară cu endonucleaza).

F

FAGOCITOZĂ - proces prin care particulele străine pătrunse în corp sau particulele mici de hrană sunt înglobate şi descompuse de către unele celule animale (fagocite). Membrana celulară a fagocitului se învaginează în jurul particulei şi apoi se închide formând o pungă sau vacuolă. Vacuola se uneşte cu un lizozom care conţine enzime care descompun particula.

FENOTIP - totalitatea caracterelor care pot fi observate la un anumit organism. Acestea sunt determinate de gene, de relaţiile de dominanţă dintre alele şi de interacţiunea genelor cu mediul.

FITOHORMON - substanţă organică sintetizată de plantă, care îi stimulează creşterea şi dezvoltarea. De obicei fitohormonii sunt produşi într-o anumită porţiune a plantei, ca de exemplu în vârful tulpinii şi sunt transportaţi în alte părţi ale ei, unde îşi exercită acţiunea.

FLAVONOIZI - grup de compuşi fenolici întâlniţi în natură, mulţi dintre ei fiind pigmenţi vegetali. Cuprind autocianii, flavonolii şi flavonele. Distribuţia compuşilor flavonoizi a fost utilizată în studiile de taxonomie vegetală.

G

GAMET - celulă reproducătoare care se uneşte cu un alt gamet pentru a forma zigotul. Exemple de gameţi sunt ovulul şi spermatozoidul. Gameţii sunt haploizi, adică posedă numai jumătate din numărul normal (diploid) de cromozomi. Gameţii se formează în urma unei diviziuni meiotice (vezi meioza).

GAMETOFIT - generaţia care, în cadrul ciclului vital al unei plante prezintă organe sexuale producătoare de gameţi. Gametofitul este haploid. Constituie faza dominantă în ciclul vital al muşchilor şi a altor briofite, generaţia saprofită depinzând în parte, sau chiar în întregime, de gametofit.

GAMETOGENEZA - procesul de formare a gameţilor.

GENĂ - unitate a eredităţii, alcătuită din ADN. La eucariote (toate organismele cu excepţia bacteriilor) genele sunt localizate pe cromozomi. Gena poate fi definită ca cel mai mic fragment de cromozom în interiorul căruia nu poate avea loc o separare prin recombinare sau care se poate transforma prin mutaţie, ambele unităţi fiind reprezentate, de fapt, de o singură pereche de baze azotate din secvenţa de nucleotide a ADN-ului. Ca unitate funcţională gena poate fi definită ca o secvenţă de nucleotide care îndeplineşte o anumită funcţie, cum ar fi sinteza unei catene polipeptidice sau a unei molecule ARN mesager, corespunzând unei anumite secvenţe a codului genetic.

Scanned with OKEN Scanner

GENETICĂ - ramură a biologiei care studiază ereditatea şi variabilitatea organismelor. Genetica clasică are la bază lucrările lui Gregor Mendel, ale cărui experienţe cu plantele (ex. mazărea) arată că ereditatea are loc prin exprimarea unor particule discrete, care mai târziu au fost numite gene. Înainte de Mendel, se presupunea că trăsăturile celor doi părinţi se amestecă, dar Mendel a demonstrat că genele rămân intacte, deşi combinaţia lor se schimbă. De la Mendel genetica a avansat mult de la genetica clasică la genetica moleculară. Iniţial a fost elucidată structura ADN (James D. Watson şi Francis Crick), iar ulterior s-a descifrat codul genetic. Aceste descoperiri au deschis posibilitatea manipulărilor genetice sau ingineria genetică.

GENOM - totalitatea genelor cuprinse într-un set unic de cromozomi (într-un nucleu haploid). Fiecare individ, prin intermediul celulelor reproducătoare, îşi transmite genomul său descendenţilor.

GENOTIP - compoziţia genetică a unui organism reprezentată de combinaţia de alele posedate. Termenul este în general folosit împreună cu fenotip.

GLICOGEN - polizaharid întâlnit în ţesuturile animale, îndeosebi în celulele musculare şi hepatice. Este un polimer puternic modificat al glucozei, reprezentând principala substanţă de rezervă de natură glucidică (gicogeneză - transformare a glucozei în glicogen).

GLICOPROTEINA - compus alcătuit dintr-un glucid legat covalent cu o proteină. Glicoproteinele se formează la nivleul aparatului Golgi prin procesul glicozilării şi reprezintă componente importante ale membranelor celulare, străbătând dintr-o parte în alta bistratul lipidic. Mulţi receptori hormonali de pe suprafaţa celulelor s-au dovedit a fi glicoproteine.

GLICOZOM - a se vedea Ciclul glioxilatului.

H

HAPLONŢ - organism aflat în stadiul haploid al ciclului de viaţă.

HAPLOID - termen care se referă la un nucleu, o celulă sau un organism care posedă un singur set de cromozomi (care nu formează perechi).

HEM - moleculă care conţine fier şi se combină cu proteinele în calitate de cofactor sau de grupare prostetică, formând hemoproteine (hemoglobină, microglobină şi citocromi). Hemul este reprezentat de o porfirină, ai cărei atomi de azot sunt chelaţi cu un atom de fier bivalent. Fierul poate să lege în mod ireversibil oxigenul (În cazul hemoglobinei şi al mioglobinei) sau (în cazul citocromilor) să transporte electroni, trecând din fier bivalent în fier trivalent şi invers.

HETEROZIGOT - termen care defineşte un organism sau o celulă în care cele două alele care ocupă un anumit locus pe cromozomii omologi sunt diferite.

HIBRIDIZAREA - producerea unui hibrid.

Scanned with OKEN Scanner

HIBRID - descendența rezultată prin încrucișarea dintre indivizi aparținând a două specii diferite. În majoritatea cazurilor hibrizii sunt infertili și incapabili de reproducere sexuată.

HISTOCOMPATIBILITATE - gradul în care un țesut preluat de la un organism este tolerat de sistemul imunitar al altui organism. Corpul identifică drept străin un țesut grefat sau un organism invadant datorită antigenelor de histocompatibilitate prezente pe suprafața sa. Fiecare individ posedă un set propriu de antigene de acest tip; în consecință, o grefă de țesut străin va fi respinsă de sistemul imunitar al organismului primitor (acceptor).

HISTONE - grup de proteine solubile în apă care intră în alcătuirea cromozomilor plantelor și animalelor alături de ADN. În compoziția lor au o pondere mare aminoacizii bazici (cu sarcină pozitivă); lizina, arginina și histidina. Se consideră că sunt implicate în condensarea și supraspiralizarea cromozomilor în cursul diviziunii celulare; intervin de asemenea în supresarea nespecifică a activității genice. Sunt absente din spermatozoizii vertebratelor și din bacterii.

HOMOZIGOT - organism sau celulă în care alelele care se găsesc într-un locus dat pe cromozomii omologi sunt identice. Organismele homozigote păstrează o linie pură dacă sunt încrucișate ca organisme identice din punct de vedere genetic.

HORMON - (1) Substanță secretată și eliberată în cantități foarte mici în circuitul sangvin de către o glandă endocrină sau de către o celulă nervoasă specializată, care reglează creșterea sau funcționarea unui anumit țesut sau organ din corp, acționând la distanță. De exemplu, insulina - hormon care reglează viteza și modul în care este utilizată glucoza în corp. Alți hormoni sunt: adrenalina, tiroxina, hormonul de creștere. (2) Substanța care stimulează creșterea la plante (fitohormoni).

I

INGINERIE GENETICĂ (tehnologia ADN-ului recombinat) - ansamblul de tehnici care urmăresc modificarea caracterelor unui organism prin inserarea de gene provenite de la alte organisme în ADN-ul său. Acest ADN modificat (cunoscut sub numele de ADN recombinat) este obținut de obicei prin clonare genetică.

INTRON - secvență de nucleotide dintr-o genă care nu codifică un produs genetic (compară cu EXON). Intronii sunt transcriși în ARN-ul mesager, dar sunt îndepărtate din transcript, înainte ca translația să aibă loc (→splicing). Sunt prezenți numai la eucariote, iar rolul lor încă nu este cunoscut.

IN VITRO - termen care se referă la procese biologice care sunt realizate în afara corpului, în cadrul unor experiențe de laborator (sensul propriu fiind „în sticlă", adică în eprubetă).

IN VIVO - termen care se referă la procese biologice studiate în mediul lor natural, adică în interiorul organismului viu.

Scanned with OKEN Scanner

Î

ÎNMULȚIRE SEXUATĂ - procesul de reproducere sexuată și producere de urmași. Înmulțirea selectivă, practicată în agricultură (de exemplu), urmărește obținerea de descendenți care să preia caracterele favorabile de la ambii părinți. Prin împerecherea unor indivizi strâns înrudiți (endogamie) se obțin homozigoți uniformi din punct de vedere fenotipic. Plantele care se autopolenizează (grâul de exemplu) intră în această categorie.

ÎNMULȚIRE ASEXUATĂ (ÎNMULȚIRE VEGETATIVĂ) - formă de reproducere asexuată la plante prin care se formează organisme noi din structuri pluricelulare, specializate (de exemplu tuberculi, bulbi) desprinse din planta mamă. La căpșuni înmulțirea vegetativă se realizează prin stoloni. Dintre metodele artificiale de înmulțire vegetativă: altoirea, butășirea ș.a.

J

JONCȚIUNEA DE TIP GAP - cale de comunicare reprezentată de un canal foarte îngust care străbate bistraturile lipidice ale plasmalemelor a două celule învecinate, prin care se realizează transferul de molecule mici și de ioni între celule.

L

LIGAZE - clasă de enzime care catalizează formarea de legături covalente utilizând energia obținută prin hidroliză ATP. Ligazele au un rol important în sinteza și repararea multor biomolecule, inclusiv de ADN și sunt utilizate în ingineria genetică pentru a insera fragmentele de ADN străin în vectorii de clonare.

LIMFOCITE - categorie de leucocite cu nucleu mare și citoplasma puțină. Limfocitele se formează în ganglionii limfatici și constituie circa un sfert din totalul leucocitelor din corp. Au un rol important în apărarea organismului și în declanșarea răspunsului imun, deoarece prezența antigenelor le stimulează să producă anticorpi. Există două tipuri de limfocite: limfocite B care produc anticorpi care intră în circulație și determină imunitatea umorală și limfocite T care determină imunitatea mediului celular.

LIZOGENIE - relația dintre un fag temperat (→bacteriofag) și o bacterie. O bacterie în al cărei cromozom s-a integrat ADN-ul unui fag temperat este numită lizogenă; ADN-ul viral este numit profag.

LIZOZOM - organit saciform delimitat de o membrană aflat în citoplasma celulelor animale; conține enzime implicate în digerarea hranei din vacuolele digestive, în distrugerea particulelor străine, pătrunse în celulă (ca de exemplu bacterii) și, la moartea celulei, în descompunerea tuturor structurilor celulare. Formațiuni similare există și în celulele plantelor.

Scanned with OKEN Scanner

LOCUS (plural LOCI) - poziţie a unei gene pe cromozom sau în molecula de ADN. Cele două alele ale genei ocupă acelaşi locus pe cromozomii omologi.

LUMEN - spaţiul din interiorul unui canal, duct sau din alt organ tubular sau saciform (ex. din interiorul vaselor de sânge sau din tubul digestiv).

M

MACROFAGE - celule fagocitare de dimensiuni mari (→fagocit); se întâlnesc în splină, ganglioni limfatici, ficat şi multe alte ţesuturi. Macrofagele ingeră bacterii şi resturi de celule; tot ele distrug hematiile îmbătrânite.

MEIOZĂ - tip de diviziune a nucleului din care rezultă patru celule reproducătoare (gameţi) având doar jumătate din numărul de cromozomi ai celulei iniţiale. Au loc două diviziuni succesive. În cursul primei diviziuni cromozomii omologi se alipesc; între ei poate avea loc un schimb de material genetic. Apoi ei se îndepărtează unul de altul şi formează nucleii celor două celule-fiice. Aceasta este de fapt diviziunea reducţională, căci cei doi nuclei care s-au format astfel posedă numai jumătate din numărul iniţial de cromozomi. Apoi cele două celule-fiice se divid mitotic, rezultând patru celule haploide.

METABOLISM - totalitate a reacţiilor chimice care au loc în organismele vii. Diversele substanţe care iau parte la aceste reacţii sau care rezultă din ele se numesc metaboliţi. La animale, mulţi metaboliţi se obţin prin digerarea hranei, pe când la plante numai materiile de bază iniţiale (dioxid de carbon, apă şi săruri minerale) provin din exterior. Sinteza (anabolism) şi descompunerea (catabolism) celor mai multe substanţe se produce printr-o suită de reacţii care este numită cale metabolică.

METAFAZĂ - stadiu al diviziunii celulare în cursul căreia membrana nucleară se distruge, se formează fusul de diviziune iar cromozomii se fixează prin centromeri formând placa ecuatorială. În metastaza I a meiozei se ataşează perechile de cromozomi (bivalenţi) pe când în mitoză şi în metafaza a II-a a meiozei se ataşează cromozomii individuali.

MITOCONDRIE - organit din citoplasma celulelor vegetale şi animale în care are loc respiraţia aerobă; este sediul ciclului Krebs şi al lanţului de transport al electronilor, deci al producţiei de energie din celulă.

MITOZĂ - tip de diviziune nucleară din care rezultă două celule-fiice, având fiecare un nucleu care conţine acelaşi număr şi acelaşi fel de cromozomi ca şi celulele-mamă. Modificările care au loc în decursul diviziunii pot fi observate uşor cu un microscop obişnuit. Fiecare cromozom se divide în lungime în două cromatide, care se despart şi formează cromozomii celor doi nuclei ai celulelor-fiice.

MUTANT - genă sau organism care a suferit o modificare transmisibilă ereditar, îndeosebi una cu efecte vizibile (o modificare în genotip asociată cu modificarea fenotipului) → mutaţie.

Scanned with OKEN Scanner

MUTAȚIE - modificare bruscă, aleatorie, a materialului genetic al celulei, în urma căruia celula respectivă și toate celulele provenite din ea pot să aibă un aspect sau un comportament diferit de cel al tipului normal. Organismul afectat de o mutație (în special de o mutație cu efecte vizibile) este denumit MUTANT. Mutațiile somatice afectează celulele care nu sunt implicate în reproducere și ca atare se manifestă doar în țesuturile unui singur organism, însă mutațiile care afectează celulele reproducătoare sau cele din care provin acestea pot fi transmise descendenților, determinând o dezvoltare anormală, dar o mică parte din ele pot duce la o mai bună adaptare a organismului; acest gen de mutații se răspândesc în interiorul unei populații din generație în generație prin selecție naturală. De aceea, acest proces este foarte important pentru evoluție, mutațiile constituind în ultimă instanță sursa variabilității genetice.

N

NUCLEOTID - compus organic alcătuit dintr-o bază azotată purinică sau pirimidinică legată de un glucid (riboză sau dezoxiriboză) și o grupare fosfat. ADN-ul și ARN-ul sunt alcătuite din lanțuri lungi de nucleotide.

NUCLEU - corpuscul de dimensiuni mai mari, aflat în citoplasma tuturor celulelor eucariote; conține material genetic reprezentat de ADN. Nucleul îndeplinește rolul de centru de control al activității celulei.

NUCLEOL - corpuscul mic, dens, sferic, prezent în nucleul interfazic al celulelor vegetale și animale; este alcătuit din proteine, ADN și ARN ribozomal. Joacă un rol important în producerea ribozomilor (și deci în sinteza proteinelor).

O

OLIGONUCLEOTID - polimer alcătuit dintr-un număr mic de nucleotide.

OMG (ORGANISME MODIFICATE GENETIC) - Organisme al căror genom a fost modificat prin metode specifice ingineriei genetice, care au făcut posibilă includerea unor noi gene. Transferul unei gene de la un organism la altul a devenit posibil în urma cunoașterii faptului că toate organismele vii, animale, bacterii, virusuri, posedă același sistem de codificare și se expresie a informației genetice. Această universalitate oferă posibilitatea de a determina exprimarea într-un organism a unei gene (a unei informații genetice) provenite de la un alt organism viu, indiferent dacă este plantă, animal, bacterie sau virus. OMG au făcut posibilă crearea soiurilor transgenice.

ONCOGEN - termen care se referă la o substanță chimică, un organism sau un factor de mediu care provoacă apariția cancerului. Multe virusuri conțin gene (cunoscute sub numele de oncogene) ce sunt responsabile de transformarea unei celule gazde normale într-o celulă canceroasă.

Scanned with OKEN Scanner

OPERON - unitate funcțională integrantă a mediului genetic; acest model a fost propus de Jacob și Monod pentru a explica reglarea activității genelor la bacterii. Este alcătuit din gene structurale, care codifică proteine și loci adiacenți care controlează activitatea acestora.

ORGANIT - structură foarte mică prezentă în interiorul celulelor animale și vegetale, care îndeplinește o anumită funcție. Exemple de organite sunt nucleul, mitocondriile și lizozomii.

P

PEROXIZOM - organit prezent în citoplasma tuturor celulelor vegetale și animale; conține mai multe enzime implicate în procesele de oxidare. Peroxizomii sunt înconjurați de o singură membrană. Au un rol activ în procesul de detoxificare, fiind deosebit de abundenți în celulele parenchimatice.

PLASMĂ - component lichid al sângelui. Este constituită din apă în care sunt dizolvate numeroase substanțe printre care proteine, săruri, factori nutritivi (glucoză, aminoacizi, lipide), hormoni, vitamine etc. (plasmă sangvină).

PLASMID - structură prezentă în celule; este alcătuită din ADN care poate să existe și să replice independent de cromozomi. În cazul celulelor bacteriene, plasmidele conțin informația genetică pentru unele activități celulare. Unele plasmide sunt utilizate ca vectori pentru clonarea genelor.

PLASMOCITE - celule producătoare de anticorpi prezente în epiletiul plămânilor și intestinului și în țesutul osteoformator. Se dezvoltă în limfă, ganglioni limfatici, splină, măduvă osoasă atunci când antigenele stimulează limfocitele să dea naștere celulelor precursoare din care să se formeze (→limfocite B).

PLASMODESME - fire fine de citoplasmă care leagă între ei protoplastii celulelor vegetale adiacente, trecând prin pereții celulari. Plamodesmele au forma cilindrică (20-40 nm diametru) și sunt căptușite de membrana plasmatică a celor două celule adiacente.

PLASTIDE - organite prezente, adesea în număr mare, în celulele vegetale. După nucleu, plastidele sunt cele mai mari incluziuni solide din celula vegetală.

PLASMOLIZA - pierdere de apă prin osmoză de către o celulă vegetală în asemenea măsură încât protoplasma se desprinde de peretele celular. Acest fenomen are loc atunci când celula se află într-o soluție cu concentrație mai mare decât cea a sucului celular, deci cu potențial hidric mai scăzut (deoarece apa se deplasează întotdeauna din ariile cu potențial hidric ridicat spre cel cu potențial hidric scăzut).

PINOCITOZA - proces prin care o celulă vie înglobează o picătură foarte mică de lichid. Mecanismul este similar FAGOCITOZEI.

Scanned with OKEN Scanner

PIRIMIDINĂ - bază azotată organică, greu solubilă în apă, din care rezultă o serie de derivaţi importanţi din punct de vedere biologic, printre care se evidenţiază uracilul, timina şi citozina care se întâlnesc în nucleotide şi în acizii nucleici (ADN şi ARN).

POLIGENĂ - genă care face parte dintr-un grup de gene care influenţează un caracter cantitativ, de exemplu înălţimea unei persoane.

POLIPEPTID - peptid alcătuit din mai mulţi aminoacizi. Polipeptidele care alcătuiesc proteinele conţin de obicei 100-300 aminoacizi. Proprietăţile unui polipeptid sunt determinate de tipul şi secvenţa de aminoacizi care îl constituie.

POLIRIBOZOM - agregat care se formează din ribozomi şi o moleculă de ARN mesager în cursul procesului de translaţie.

POLIMERAZA - enzimă care catalizează alungirea unei molecule polimerice.

POLIMORFISM - existenţa mai multor forme, distincte în cadrul unei specii vegetale sau animale. Există cazuri de polimorfism ambiental, diferenţe fiind determinate de factorii de mediu, nu de factorii genetici. Există şi cazuri de polimorfism ereditar sau genetic, diferenţele fiind rezultatul unor caractere moştenite.

PRION - formă anormală a unei proteine celulare normale care se găseşte în creierul mamiferelor şi care este considerată a fi agentul care provoacă ancefalopatia spongiformă bovină şi maladia Creutzfeld-Jakob la om. Rezultă din mutaţia genei proteinei normale (PrP) şi se consideră că prin interacţiune cu proteina prionică normală se acumulează în creier şi treptat distrage celulele acestuia.

PROCARIOT - organism din regnul PROKARYOTAE. Materialul său genetic nu este inclus într-un nucleu. Bacteriile sunt procariote. Se consideră că celulele eucariote au apărut ca asociaţii simbionate de procariote.

PROFAZĂ - primul stadiu al diviziunii celulare, în cursul căruia cromozomii se contractă şi se divid longitudinal (cu excepţia centromerului) în cromatide. În mitoză, cromozomii rămân separaţi unul de altul. În prima parte a meiozei, cromozomii omologi formează perechi. La sfârşitul primei profaze cei doi cromozomi încep să se despartă.

PROMETAFAZĂ - perioadă din stadiul incipient al metafazei în care cromozomii se ataşează de fibrele fusului de diviziune şi se aliniază în unghi drept faţă de polii fusului, într-un plan care trece drept centrul celulei.

PROTOPLASMĂ - material granular care cuprinde partea vie a unei celule, respectiv ansamblul constituenţilor celulei, cu excepţia vacuolelor mari şi a materiei ingerate recent sau a celei care urmează a fi excretată. Cuprinde un nucleu, înglobat într-o citoplasmă gelatinoasă şi membrana plasmatică (celulară).

PROTOPLAST - unitatea vie (protoplasma) unei celule, alcătuită din nucleu şi citoplasma, înconjurată de membrana celulară. Protoplastii celulelor bacteriene şi vegetale se

Scanned with OKEN Scanner

pot obține prin îndepărtarea peretelui celular; sunt utilizați pentru a se studia procesele legate de metabolismul celular și de reproducere.

PURINĂ - bază azotată organică moderat solubilă în apă, din care provine un grup de derivați importanți din punct de vedere biologic, îndeosebi adenina și guanina care se întâlnesc în nucleotide și în acizii nucleici (ADN și ARN).

R

RECOMBINARE - rearanjare a genelor ce are loc în momentul formării celulelor reproducătoare (gameți → crossing over). Are ca rezultat apariția unor descendenți care prezintă o combinație de caractere diferite de cele ale părinților. Recombinarea poate fi indusă și superficial prin tehnici de inginerie genetică.

REPLICAȚIA (replicarea) ADN-ului - procesul prin care o moleculă de ADN servește drept matriță pentru sinteza unei molecule noi, identică cu prima; este reglat de o enzimă numită ADN polimerază.

REPRESOR - proteină ce poate împiedica exprimarea unei gene.

RIBOZOMI - particule sferice de dimensiuni mici, prezente în celulele vii, la nivelul cărora are loc sinteza proteinelor. Ribozomii sunt formați dintr-un anumit tip de ARN și proteine. Într-o celulă sunt de obicei mai mulți ribozomi. În timpul sintezei proteice se asociază cu ARN-ul mesager, formând poliribozomii în procesul de translație.

S

SAPROFIT (forma veche) SAPROTROF - un organism care își procură hrana din țesuturile moarte ale altor organisme. Majoritatea fungilor sunt saprofiți (restul fiind paraziți). Saprofiții nu își pot produce singuri hrana, deci fac parte dintre HETEROTROFI. Ei sunt foarte utili datorită capacității lor de a transforma materia organică în nutrienți ușor accesibili plantelor verzi.

SEGREGARE - separarea perechilor de alele în timpul formării celulelor reproducătoare, astfel încât fiecare dintre acestea conține numai o singură alelă din perechea inițială. Segregarea este rezultatul separării cromozomilor omologi, care are loc în timpul meiozei.

SOLUȚIE HIPERTONICĂ - soluția cu un potențial al apei mai scăzut și respectiv cu o presiune osmotică mai mare decât altă soluție.

SOLUȚIE HIPOTONICĂ - soluție cu un potențial al apei mai mare, respectiv presiune osmotică mai mică, decât o altă soluție.

SOMATIC - (1) Termen care se referă la toate celulele unui organism vegetal sau animal, cu excepția celulelor reproducătoare. O mutație somatică nu se transmite la des-

Scanned with OKEN Scanner

cendenţi. (2) Termen care se referă la acele organe şi ţesuturi ale unui organism care sunt diferite de tubul digestiv şi structurile asociate acestuia.

SOUTHERN BLOTTING - tehnică cromatografică folosită pentru izolarea şi identificarea unor fragmente specifice de ADN, ca de exemplu fragmentele rezultate în urma scindării sub acţiunea enzimelor de restricţie. Amestecul de fragmente este supus electroforezei în gel de agar, după care urmează denaturarea pentru a obţine fragmente monocatenare. Acestea sunt transferate pe un filtru de nitroceluloză unde sunt mobilizate în poziţiile lor relative; se adaugă apoi genele marcate cu radioizotopi. Acestea hibridează cu fragmentele complementare de pe filtru, putând fi apoi observate prin autoradiografie. Tehnica a fost pusă la punct de E.M. Southern. O tehnică similară pentru detectarea ARN-ului a fost denumită prin analogie tehnica Northern Blotting.

SPLICING (matisare) - (din engleză : „to splice"- a matisa, a îmbina cap la cap) - stadiu al procesării ARN-ului mesager întâlnit numai la celulele eucariote în cursul căruia sunt eliminate segmentele intornice necodificatoare din transcriptul primar, iar exonii sunt uniţi formând molecula funcţională de ARNm. Procesul este catalizat de un complex de proteine şi moecule de ARN de dimensiuni mici numit spliceosom.

STAPHYLOCOCUS - gen de bacterii sferice imobile, Gram-pozitive, larg răspândite ca saprofite sau parazite. Celulele lor formează aglomerări asemănătoare unor ciorchini. Multe specii se găsesc pe piele sau mucoase; unele dintre ele pot produce boli la oameni şi animale.

STROMA - ţesut care formează masa fundamentală a unui organ; de exemplu matricea gelatinoasă a cloroplastelor în care se află grânele.

SUPEROXID DISMUTAZA (SOD) - enzimă larg răspândită, care îndepărtează radicalul superoxid (O_2) cu formarea de oxigen molecular şi peroxid de hidrogen, conform reacţiei ($O_2+O_2+2H^+ \rightarrow O_2+H_2O_2$). Peroxidul de hidrogen format este îndepărtat prin acţiunea catalazei. Anionul superoxid care lezează ţesuturile este un radical liber, format prin reducerea parţială a oxigenului molecular, este produs în cursul metabolizării diferitelor toxine şi ca parte a răspunsului imun declanşat de prezenţa bacteriilor şi celulelor infectate cu virusuri.

T

TELOFAZA - stadiu din diviziunea celulară. În mitoză cromatidele care s-au separat în anafază se adună la polii fusului. În jurul fiecărei grupe se formează o membrană nucleară, rezultând doi nuclei-fii cu acelaşi număr şi acelaşi fel de cromozomi ca şi nucleul iniţial al celulei. În telofaza I a meiozei, toţi cromozomii formează nucleii-fii. De aceea numărul de cromozomi din aceşti nuclei este jumătate din numărul iniţial de cromozomi. În a II-a telofază, nucleii-fii se formează din cromatide (ca în mitoză).

Scanned with OKEN Scanner

TEST AMES - metodă de stabilire a gradului în care un medicament sau o altă substanță xenobiotică poate să producă mutații.

TILACOIDE - structuri membranare plate, saciforme dispuse cap la cap, care alcătuiesc o grană în cloroplastele celulelor vegetale. Clorofila și alți pigmenți fotosintetizatori sunt situați la nivelul membranelor tilacoidale, locul în care se desfășoară faza de lumină a fotosintezei. Fotoliza apei are loc în spațiul dintre membranele tilacoide.

TONOPLAST (membrană vacuolară) - membrană unică ce delimitează vacuolele din celulele vegetale.

TRANSCRIPȚIE - transcrierea diferitelor părți din mesajul genetic înregistrat în molecula ADN mesager, cu secvența corespunzătoare a nucleotizilor.

TRANSDUCȚIE - (1) Transfer de material genetic de la o celulă bacteriană la alta prin intermediul unui bacteriofag. (2) Conversia stimulilor detectați de celulele receptoare în impulsuri electrice care sunt transportate prin sistemul nervos.

TRANSGENIC - termen care se referă la un organism al cărui genom încorporează gene ale unei alte specii, gene ce vor fi exprimate în fenotip. Indivizii transgenici sunt creați prin inginerie genetică, utilizându-se vectori adecvați pentru inserarea genelor străine dorite într-un ovul fecundat sau într-un embrion în stadiu incipient. Organismele transgenice prezintă un potențial ridicat de utilizare ecomomică (ex. plantele ar putea dobândi rezistență la boli și dăunători).

TRANSLAȚIE (traducere) - proces ce are loc în celulele vii, prin care informația genetică codificată în ARN mesager (ARNm) sub forma unor secvențe de trei nucleotide (codoni) este tradusă într-o secvență de aminoacizi dintr-un lanț polipeptidic în timpul sintezei proteice. Traducerea are loc în ribozomii din citoplasmă. Ribozomii se mișcă în lungul moleculei de ARNm „citind" pe rând fiecare codon. Moleculele din ARN de transfer (ARNt) purtând fiecare un anumit tip de aminoacid, sunt aduse în ordine în lungul moleculei de ARNm; are loc împerecherea bazelor codonului cu tripletul de baze complementare al ARNt. În acest fel aminoacizii sunt asamblați într-o secvență corectă pentru a forma lanțul polipeptidic.

TRANSPOZON - element genetic mobil care se poate insera în diverse locusuri în lungul cromozomului. Cele mai simple tipuri de transpozomi sunt cunoscute sub denumirea de secvențe de inserție.

TRIPSINĂ - enzimă care degradează proteinele. Este secretată în formă inactivă (tripsinogen) de către pancreas și este eliminată în duoden unde tripsinogenul este activat de o altă enzimă (enterokinaza) produsă în duoden și dă naștere la tripsină.

V

VECTOR - (1) Organism animal, de obicei insectă, care transmite pasiv microorganisme patogene de la un animal la altul, de la o plantă la alta, sau de la un animal la

Scanned with OKEN Scanner

om. (2) (Vector de clonare) - element utilizat în clonarea genică pentru a insera un fragment de ADN străin în genomul celulei gazdă. Pentru gazde bacteriene se utilizează trei tipuri de vectori: bacteriofagi, plasmide şi derivaţi hibrizi ai acestora (cosmide). Retrovirusurile pot fi vectori eficienţi pentru introducerea de ADN recombinat în celulele mamiferelor. La plante, sunt utilizaţi ca vectori derivaţi ai plasmidului care induce tumori de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens.*

VIRUS - particulă prea mică pentru a putea fi observată cu ajutorul microscopului optic sau pentru a fi reţinută de un filtru, dar care are metabolism propriu şi este capabilă să se reproducă în interiorul unei celule vii. Când nu se află într-o celulă gazdă, virusul este complet inert. Virusurile mature (virionii) au dimensiuni cuprinse între 20 şi 400 nm diametru. Sunt alcătuite dintr-o regiune centrală ce conţine acid nucleic (ADN sau ARN) încorporată de un înveliş proteic (→capsidă).

Z

ZIGOT - gamet femel fecundat; rezultă în urma fuziunii nucleului ovulului cu nucleul spermatozoidului sau al granulei de polen.

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. **ALGARA D.S. (2004)** – *Misterul rezistenţei la SIDA a fost elucidat*, Science et vie, februarie.
2. **ALBERTS B, BRAY D., LEWIS J., RAFF M.,ROBERTS K., WATSON J.D. (1995)** – *Mollekularbiologie der Zelle*, Ed. 3, Weinheim, Germania.
3. **ALBERTS B., JOHNSON A., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P., (2004)** – *Mollekularbiologie der Zelle*, Ed. 4, Wiey –Eeh, Weinheim, Germania.
4. **ANDERSON E.D., STARK D.M., NELSON R.S. şi altii (1989)** – *Transgene plants that express the coat protein gene of TMV or AlMV interfere with disease development of non-related viruses*, Phytopathology 12, pag. 1284 – 1290.
5. **ANDERSON A. (1992)** – *The evolution of sexes*, Science, 17. iulie.
6. **BADEA M.E., SANDULESCU D. (2001)** – *Biotehnologii vegetale*, Fundatia Biotech, Bucureşti.
7. **BAINS W. (2004)** – *Biotechnology*, from A. Topz, Ed. 3 , Oxford Univ.-Press.
8. **BEARDSLEY T. (1994)** – *Krebs – Eine ermuchtende Billanz*, Spektrum der Wissenschaft, martie.
9. **BECKER W.M. şi colab. (1996)** – *The world of the cell*, Ed. 3- Ed. Menlo – Park.
10. **BERCA M. (2001)** – *Omul faţă în faţă cu el însuşi*, Agricultorul Român.
11. **BERCA M. (2001)** – *Terorismul poate lovi producţia de alimente*, Economistul.
12. **BERCA M. (2002)** – *De la genom la boala vacii nebune*, Editura Ceres.
13. **BERCA M. (2003)** – *Inducerea mutaţiilor de către substanţe chimice carcinogene*, aprilie, Agricultorul român.
14. **BERCA M.** – *O afacere fantastică „în căutarea sănătăţii veşnice"*, Economistul.
15. **BERCA M.** – *Protecţia patrimoniului genetic şi biologic şi a realizărilor tradiţionale româneşti*, Agricultorul Român.
16. **BERCA M. (2004)** – *Biopirateria – Probleme globale ale biodiversităţii*, Agricultorul Român.
17. **BERCA M. (2004)** – *Perspective fantastice pentru energia viitorului*, Economistul.
18. **BERG M.J., TYMOCZKOL J., STYRER L. (2003)** – *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
19. **BERG D., TEITFEN K. şi colab. (1998)** – *Brighton Crop Protection Conference Weeds*, 2-491-500
20. **BOTU IOAN şi colab. (2002)** – *Catalog pentru soiuri şi material săditor pomicol*, Editura Ceres.
21. **BOUTSALIS P., KAROTOM J., POWLES S.B. (1999)** – *Molecular basis of resistance to acetolactate synthese-inhibiting herbicides in Sisymbrium orientate and Brassica tourneforti*, Pesticide Science 55, pag. 507-516.
22. **BROWN T.A. (2002)** – *Gentechnologie für Einsteiger*, Ed. 3, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.
23. **BRUNKE K.J., MERRVSEN R.L. (1991)** – *Insect control with genetically engineered-crops*, Trends Biotechnical 9, pag. 197-200.
24. **CAMPBELL A.N. (2000)** – *Biologie*, Ed.5, Spectrum Akademischer Verlag.
25. **CAMPBELL A.N. (2003)** – *Biologie*, Ed.6, Spectrum Akademischer Verlag.
26. **CAPECCHI M.R. (1989)** – *Altering the genome by homologous recombination*, Science 244, pag. 1288-1292.
27. **CAVENCE W.K., WHITE R.L. (1995)** – *Anhäufung*, genetische Deffekte bei Krebs, Spektrum der Wissenschaft, mai, pag. 36-45.
28. **CHENG J., BALYARDUR M.J., SAXENA R.C., STICKEN M.B. (1992)** –*Production of insect resistent potato by genetic transformation with endotoxin from Baccilus thringiensis*, var Kurstaki, Plant Sciences 81, pag. 83 – 91.

Scanned with OKEN Scanner

29. **CRIEK F.M.C., WATSON J.D. (1954)** – *The complementary structure of Deoxyribonucleic acid* , Proc. Roy society A-223, pag. 80.
30. **CULOTTA E., KOSHLAND D.E. JR. (1994)** – *DNA repaire works,* it's way to the top, Science, 23, Decembrie.
31. **DECHENWALD M. (2003)** – *Transformarea leucocitelor în celule organice,* Focus, 50, dec. pag. 112.
32. **DE DUVE C. (1992)** – *Die Zelle,* Heidelberg, Spectrum Akademischer Verlag.
33. **DE FELICE M., GUARDIOLA J., ESPOSITO B., LACCARINO M. (1974)** – *Structural genes for a new neognized acetolactate synthase in Escherichia coli K 12,* Journal of Bacteriology ,120, pag. 1068-1077.
34. **DELANNY X. B.J., LA VALLEE R.K., PROKSH R.L., FUCHS S.R., SIMS J.T. s.a.** – *Fiels performance of transgenic tomato plants espressing the Bacillus thurigiensis,* Biotechnology, 7, pag. 1265 – 1269.
35. **DEVING M.D., PRESTOM C. (2000)** – *The molecular basis of herbicide resistance in herbicides and their mechanism of action,* Ed. AN Cobb and RC Kirkwooh, pag. 72-104, CRC Press Boca Raton, Fl. USA.
36. **DOERFLER W. (2002)** – *Viren,* Fischer Taschenbuch Verlag, Frankfurt, octombrie.
37. **DUNN I.S., BLATTNER F.D. (1987)** – *Charons 36 to.40: Multienzyme,* high-capacity, recombination-deficient replacement vectors with polylinkers and polystuffers., Nucl. Acids Res. 15, pag. 2677-2701.
38. **EIGEN M. (1993)** – *Viral quasispecies,* Scientific american, iulie.
39. **ERLICH H.A. (1992)** – *P.C.R. Technology: principle and applications for DNA amplification,* Ed. Freeman and Co.
40. **FĂRĂ AUTOR (2002)** – *Modul de acțiune al inhibitorilor transcriptazei inverse,* Science et vie, decembrie, pag. 133.
41. **FĂRĂ AUTOR (2004)** – *Focus 19,* pag. 101 – 102.
42. **FRANK J. (2003)** – *The ribosone - a molecular machine par exellence,* Chem. Biologie 7, pag. 133-141.
43. **FRASER C.M., GOCOYNE J.D., WITE O. (1997)** – *The minimal gene complement of Micoplasma genitalium,* Science 27, pag. 397-403.
44. **GIBBAN A. (1993)** – *Where are new viruses born ?,* Science, 6. august.
45. **GLICK R. BERNARD, PASTERNAK J. JACK (1995)** – *Moleculare Biotechnologie,* Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.
46. **GOFFEAU A. (1996)** – *Life with 6000 genes,* Science 274, pag. 546.
47. **GOLDBERG A. L. (1995)** – *Functions of the Proteasome. The lysis at the end of the tunel,* Science , 28 aprilie.
48. **GREEN R.,** *Ribosomal translacation.*
49. **GRIFFITH A.F.G. (1997)** – *An introduction to genetic analysis,* Ed. 6., W.H. Freeman Dn. Co.
50. **GRIFFITH A.F.G., MILLER J.N., SIZUKI D.T., LEWENTIN R.C., GELBURT R.C. (1993)** – *An introduction to genetic analysis,* Ed. 5, New York, Ed. W.H. Freeman.
51. **GROSS M. (1996)** – *Neues zur Biosynthese von Proteinen,* Spektrum der Wissenschaft, martie, pag. 21-24.
52. **GRUNSTEIN M. (1993)** – *Die Rolle der Nistone bei der Genregulation,* In Spektrum der Wissenschaft, ianuarie, pag. 90-101.
53. **HALFTER G., MORIS P.C., WELLMITZER L.** – *Gene targeting in Arabidopsis thaliana,* Mol. Gen. Genet. 231, pag. 186 – 193.
54. **HARTWELL L.H. (1967)** – *Macromolecule sybthesis in temperature- sensitive mutants of yeast,* J. Bacteriol, pag. 1662 – 1670.
55. **HARTWELL L.H. (1974)** – *Genetic control of the cell division cycle in yeast,* Science 183, pag. 46 - 51.
56. **HEAP I. (2003)** – *International survey of herbicide resistant weeds,* (document WWW) URL http/www. weedsciente.com).
57. **HELDT H.W. (2003)** – *Pflanzenbiochemie,* Ed. 3, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg-Berlin.

Scanned with OKEN Scanner

58. **HUBERT ROBERT** - *Lexikon der Biologie.*
59. **JOHNSON R.T., RAO PH. (1970)** – *Biol. Revu,* 46-97.
60. **KATALYSE-INSTITUT (1999)** – *Gentechnik in Lebensmitteln,* Rowohlt Taschenbuchverlag GmbH, iunie.
61. **LANGBEIN K., SKALNIK C., SMOLEK I. (2002)** – *Biotesor* , Deutscher Verlag, Stuttgart/München.
62. **LEWIN B.(1998)** – *Molekularbiologie der Gene,* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg+Berlin.
63. **LODISH, BERK A., ZIPURSKY S.L., MATSUDAIRA P., BULTIMAN D., DANELL E.J. (2000)** – *Zellbiologie,* Ed. 4, Heidelberg, Berlin, Spektrum Akademischer Verlag.
64. **LODISH N., BALTIMORE D., BRRK A., ZIPUSKY L.S., DARNELL P. (2001)** – *Mollekulare Zellbiologie,* Ed.2, Berlin Verlag. Grytis.
65. **MARX J. (1994)** – *How cells cycles cycle toward cancer,* In Science, 21, ianuarie.
66. **MECLINTOCK B. (1984)** – *Science 266,* pag. 792-800.
67. **MELNTASH J.R., MCDONALD K.L. (1990)** –*Die Mitosespindel,* Spektrum der Wissenschaft, Juli.
68. **MURRAY A.W. , HUNT C., (1993)** – *The cel cycle. An introduction* , New York, Ed. W.H. Freeman.
69. **MURRAY A.W., KIRSCHNER W. (1991)** – *Wie die Proteine den Zellzyklus steuern,* Spektrum der Wissenschaft, Mai.
70. **NOVAK R. (1994)** – *Matrix work wins acclaim seicener (Despre transmiterea semnelor matricei estracelulare),* 7 ianuarie.
71. **NOVAK R. (1994)** – *Mining Treasures from junk DNA,* in Science 4, februarie.
72. **OELLER P.W. si colab. (1991)** – *Reversible inhibition of tomato fruit senescience by antisense RNA,* Science 254, pag. 437-439.
73. **PARC K.W., MALLORY-SMITH C.A. (2004)** – *Physiological and molecular basis for ALS inhibitor resistance in bromus-tectorum biotypes,* Weed research 44, 2, pag. 72-77.
74. **PRUSINER S.B. (1995)** – *Prionen – Erkrankungen,* Spektrum der Wissenschaft, martie, pag. 44-51.
75. **RENNIE J. (1993)** – *Neue Drehs der DNA,* Spektrum der Wissenschaft, Mai, pag. 32-42.
76. **RERISI J.L., IYER V.R., BROWN P.O. (1992)** – *Exploring the metabolic and genetic control of gene expresion on a genomic scale,* Science 278, pag. 680 -686.
77. **ROBERTS R.J., MACALIS D. (1997)** – *Rebase – restriction enzymes and methylases,* Nucl. Acid , Res. 25, pag. 248-262.
78. **ROTHMAN J.E., ORCI L. (1996)** – *Knospung von Transportvesikeln in Zellen.Spektrum der Wissenschaft,* Mai.
79. **TIJAN R.(1995)** – *Das menschliche Transkriptionsapparat,* Spektrum der Wissenschaft, aprilie , pag. 56 – 65.
80. **THE C. ELEGANS CONSORTIUM (1998)** – *Genome sequence of the nematode C. elegans; a platform for investigation biology,* Science 282, pag. 2011 – 2045.
81. **SACHA A.B., VARVI G.** – *Eucariotic translation imitation: there area (at last two side to every story),* Nat. Struct. Biol. 7., pag. 356 - 361.
82. **SAIKI R.K., GELFAND D.H. şi colab. (1998)** – *Primer – directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science et vie,* 239
83. **SCIENCE ET VIE (2003)** – *Science et vie,* 1028, mai, pag. 124.
84. **SCIENCE ET VIE (2003)** – *Science et vie,* octombrie.
85. **SCIENCE ET VIE (2003)** - *Science et vie,* nr. 2.
86. **SCIENCE ET VIE (2004)** - *Science et vie,* 226, martie.
87. **STOSSEL T.P. (1994)** – *Der Kriechmechanismus von Zellen. Spektrum der Wissenschaft,* November.

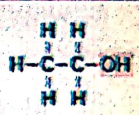
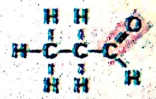
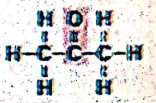
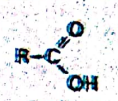
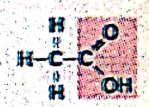
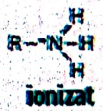
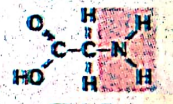
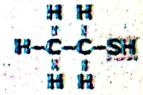
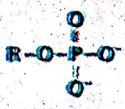
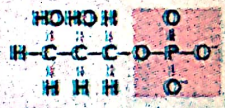
Scanned with OKEN Scanner

88. **VAN RIE J.** – *Resistance control with transgenic plants,* Resistance proof, Trend Biotechnology 9, pag. 177-179.
89. **VATAU I., BARBU A. (1999)** – *Elemente de inginerie genetică,* Ed. All Educational.
90. **WALDROP M. (1989)** – *Structure of the second genetic code,* Science, decembrie.
91. **WATSON J.D., CRIEK F.M.C. (1953)** – *Molecular structure of nuclein acids. Nature 171,* pag. 738.
92. **WATSON J.D. (1997)** – *Die Doppelhelix,* Hamburg- Rowohlt.
93. **WISE J. (1993)** – *Guides to the heart of the spliceosome,* Science, 24. decembrie.
94. **WRIGT T.R., PENNER D.** – *Corn (zea mays) acetolactate synthase sensitivity to four classes of ALS-inhibitig herbicides,* Weed science, 46, pag. 8-12.
95. **ZIEGLER HUBERT si colab. (2004)** – *Spectrum Akademischer Verlag.*
96. **ZIMMER A. (1992)** – *Manipulation the genome by homologues recombination in embrione stem cells,* Annual Rev. Neurosci -15, pag. 115 – 137.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 1. GRUPĂRILE FUNCȚIONALE ALE LEGĂTURILOR ORGANICE

(după Campbell A.N. și colab., 2003)

Grupa funcțională	Formula*	Numele legăturii	Exemplu
Hidroxi		alcoolică	 Etanol (substanță activă a băuturilor alcoolice)
Carbonil		aldehidică	 Propanal
		cetonică	 Acetonă
Carboxi	 neionizat	ionizat	acizi carbonici  Acid acetic**
Amino	neionizat	 ionizat	amine  Glicină (un aminoacid)
Sulfhidril			tiole  Mercaptoetanol
Fosfat			fosfați organici  Glicerinfosfat

* Litera R stă la baza legăturilor carbonice ca foarte funcțională
** În celule domină carboxilul sub formă ionică și anionică. Acidul acetic și glicina sunt prezente într-o formă nefuncțională

Scanned with OKEN Scanner

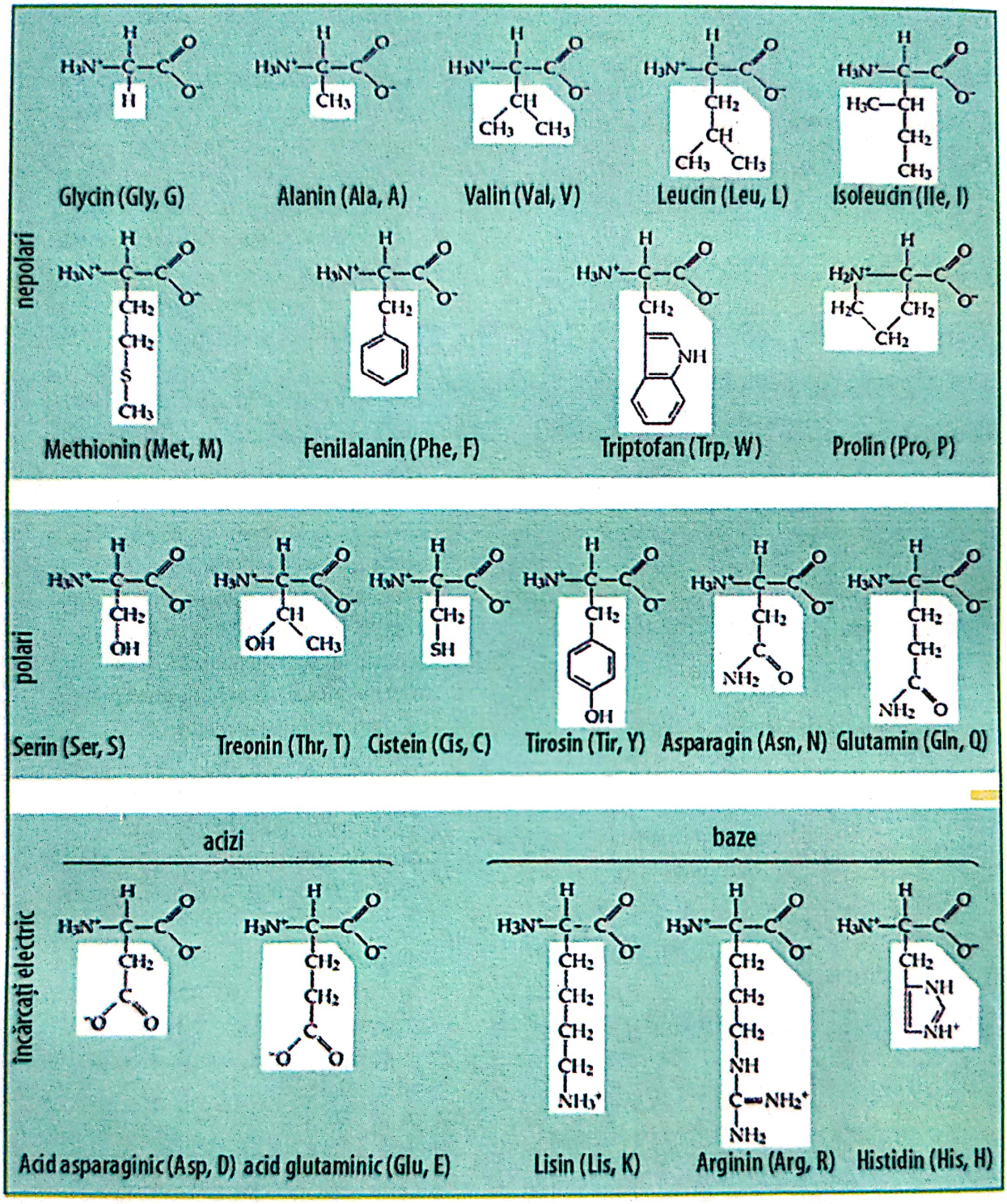
ANEXA 2. PRIVIRE DE ANSAMBLU ASUPRA FUNCȚIILOR PROTEINELOR

Tipul proteic	Funcțiune	Exemple
Proteină structurată	de susținere	Insectele și păianjenii utilizează fibrele de mătase proteică pentru a fabrica, de exemplu, țesătura coconului. Colagenul și elastinul servesc la legarea țesuturilor animalelor, precum tendoane, ligamente, benzi, o bază de susținere din fibre. Cheratinele sunt proteinele din păr, coarne, pene și alte structuri ale pielii.
De depozitare	de înmagazinare	Albumina oului este proteina din albușul ouălelor găinilor și servește ca sușă de aminoacizi pentru dezvoltarea embrionilor. Casina este proteina din lapte și este sursa principală de aminoacizi pentru tineretul sugător (purcei, viței, miei etc.). Plantele depozitează în sămânță.
Transportoare	de transport	Hemoglobina este o proteină care conține fier în sângele vertebratelor. Ea transportă oxigenul din plămâni, respectiv din Rimen, spre alte organe ale corpului. Alte proteine transportă diverse molecule prin membranele celulare în ambele direcții.
Proteine hormonale	Coordonarea activității unui organism	Insulina și glucagonul sunt 2 hormoni polipeptidici secretați de pancreas și care participă la regularizarea concentrației de zahăr din sângele vertebratelor. Alți hormoni contribuie la creșterea vertebratelor la dimensiunile fenotipice normale.
Proteine receptor	Reacția unei celule față de excitarea chimică	În membranele unei celule nervoase receptorii înglobați preiau semnale chimice pe care le transmit excitarea altor celule.
Proteine contractile	Mișcare	Actina și miosina sunt responsabile de mișcarea mușchilor. Proteinele contractile provoacă mișcările cililor și ale flagelilor care pun în mișcare bacteriile și protozoarele, dar tot ele susțin și zborul păsărilor.
Proteine de apărare	Protecție contra bolilor	Anticorpii combat bacteriile și virusurile care intră în organism.
Enzime	Selectarea vitezei reacțiilor chimice	Enzimele de digestie hidrolizează polimerii în elemente nutritive.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 3. AMINOACIZII PROTEINELOR

(după Campbell A.N. şi colab., 2003)



Proteinele sunt formate din 20 de aminoacizi. Ei sunt ordonaţi după însuşirile lanţurilor exterioare (grupărilor R colorate în alb). Aminoacizii îşi păstrează structura la un pH=7, adică la aciditatea specifică celulei. Codul aminoacizilor este prezentat în paranteză.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 4. FRECVENȚA PREZENȚEI CELOR 20 DE AMINOACIZI ÎN STRUCTURA SECUNDARĂ A PROTEINELOR

(după Buy M.J., 2003)

Aminoacizi	α-Helix	β-placă foto	cotul (Curbarea cotului)
Ala	1,29	0,90	0,78
Cys	1,11	0,74	0,80
Leu	1,30	1,02	0,59
Met	1,47	0,97	0,39
Glu	1,44	0,75	1,00
Gln	1,27	0,80	0,97
His	1,22	1,08	0,69
Lys	1,23	0,77	0,96
Val	0,91	1,49	0,47
Ile	0,97	1,45	0,51
Phe	1,07	1,32	0,58
Tyr	0,72	1,25	1,05
Trp	0,99	1,14	0,75
Thr	0,82	1,21	1,03
Gly	0,56	0,92	1,64
Ser	0,82	0,95	1,33
Asp	1,04	0,72	1,41
Asn	0,90	0,76	1,28
Pro	0,52	0,64	1,91
Arg	0,96	0,99	0,88

Aminoacizii sunt trecuți în ordinea preferinței în structura secundară de sus în jos. Se observă că Arginina nu are o preferință diferențiată semnificativ de la o grupă la alta.

Scanned with OKEN Scanner

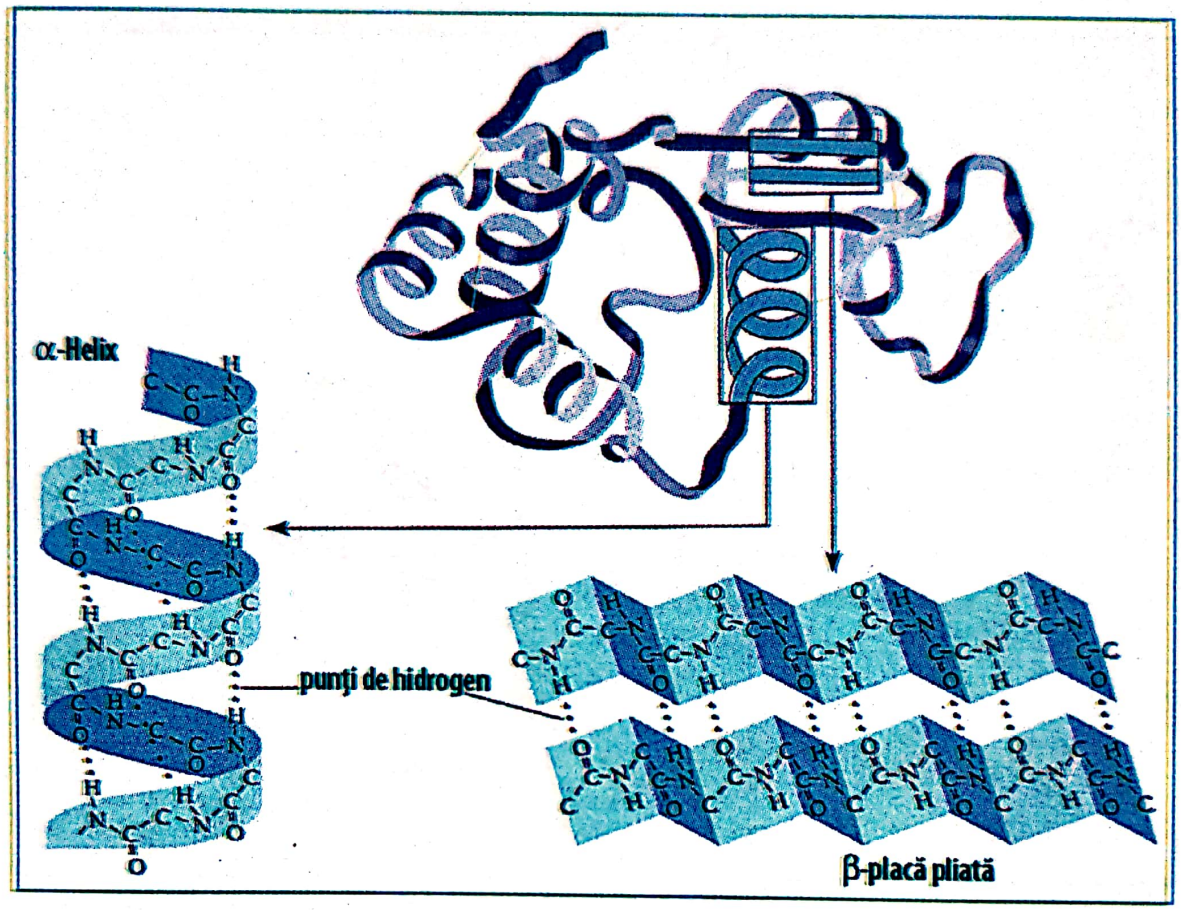
ANEXA 5. STRUCTURA PRIMARĂ A UNEI PROTEINE

Constă într-o secvență de aminoacizi tipică și neschimbabilă sau din structura primară a enzimei lizozomiei. Fiecare aminoacid este redat din primele 3 litere (*după Campbell A.N., 2000*).

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 6. STRUCTURA SECUNDARĂ A UNEI PROTEINE

(după Campbell A.N., 2000)

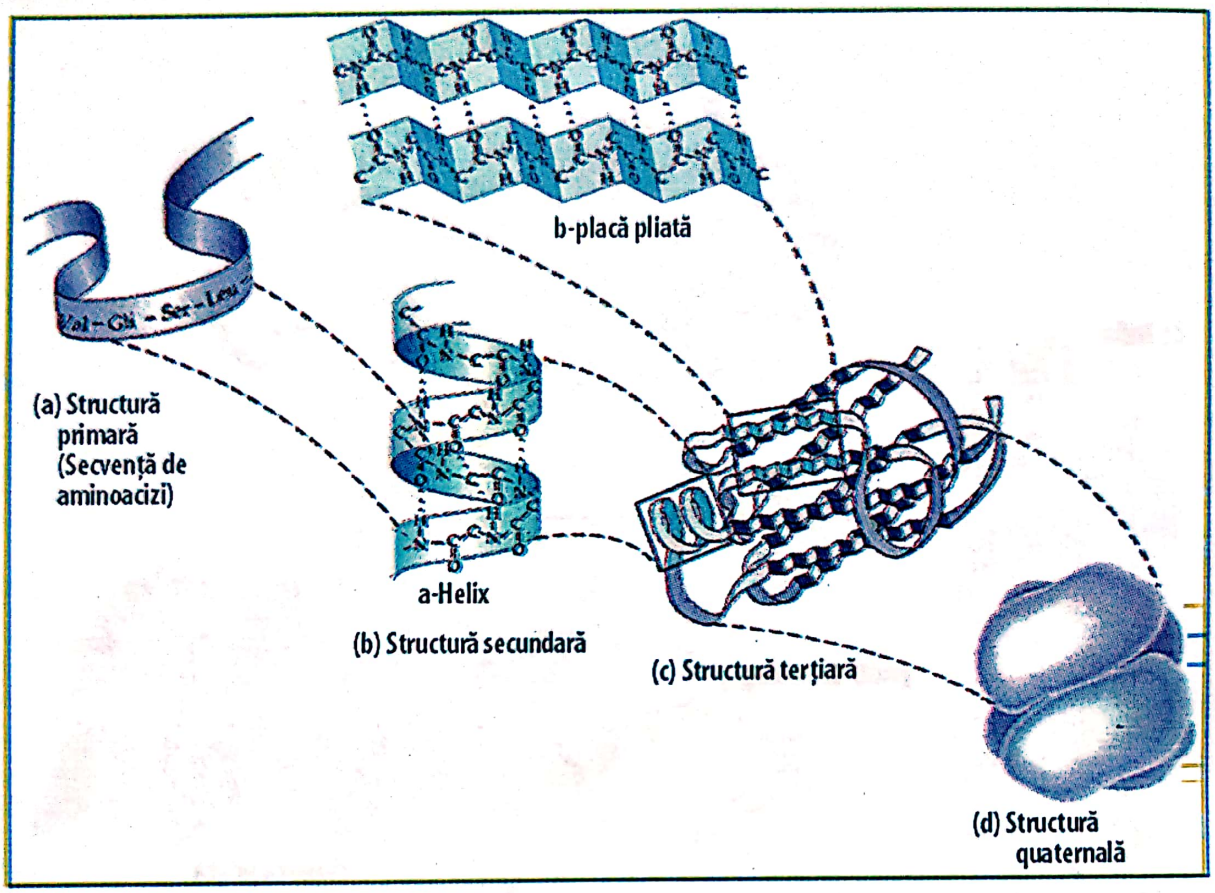


Sunt cunoscute două tipuri de proteine secundare: α-Helix şi β-placă pliată, care se întâlnesc în lizozima proteică. Cele 2 mostre ale plăcii pliate apar prin cuplarea pe lungime a punţilor de hidrogen ale lanţului polipeptidic. Grupurile R ale aminoacizilor nu participă.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 7. PRIVIRE DE ANSAMBLU ASUPRA NIVELURILOR STRUCTURALE ALE PROTEINELOR

(după Campbell A.N., 2000)

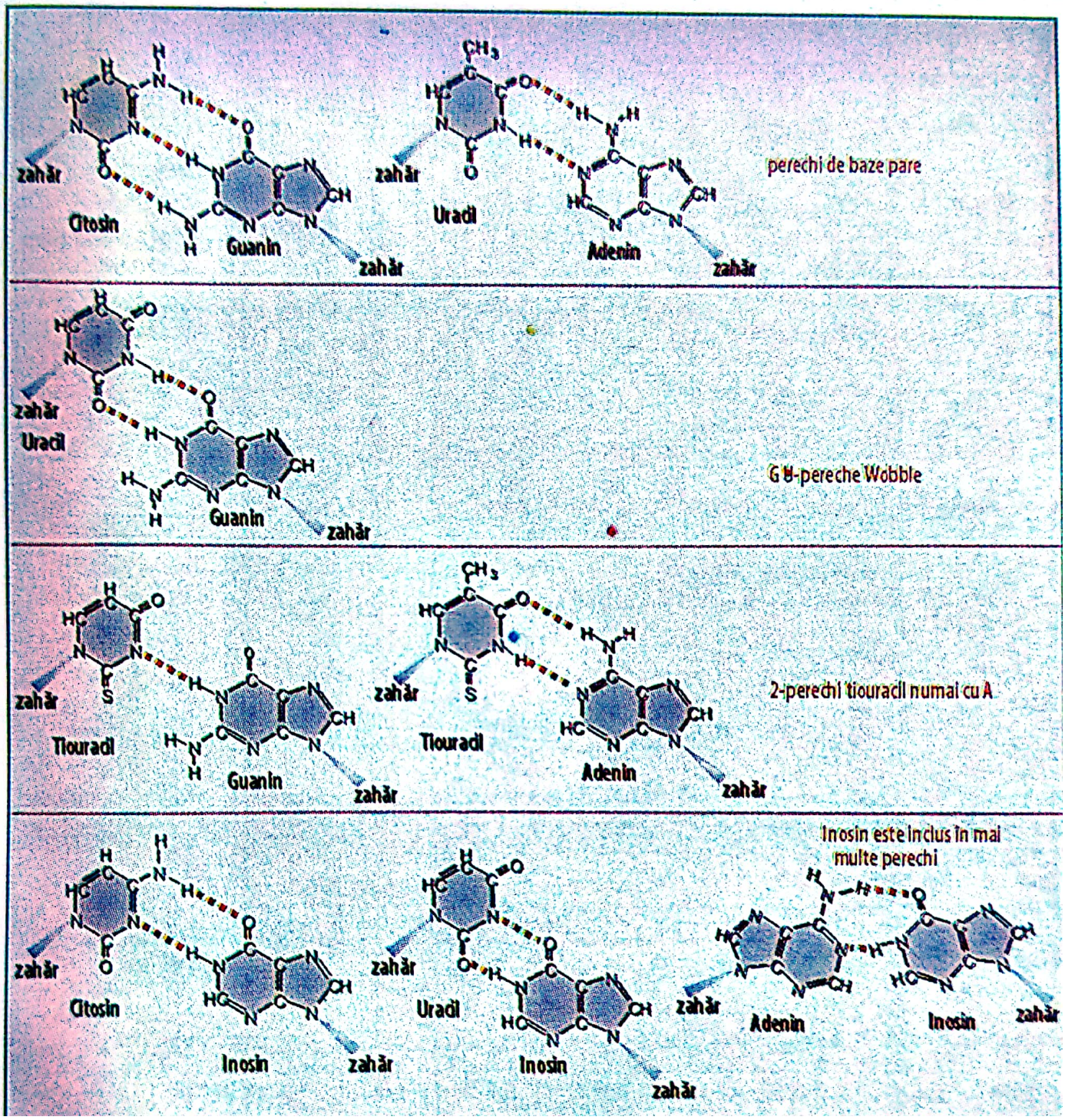


a) Structura primară este ordonată într-o înșiruire de aminoacizi legați într-un polipeptid.
b) Structura secundară constă într-o prelucrare a unui lanț polipeptidic prin formarea punților de hidrogen pe α-Helix și β-plăci.
c) Structura terțiară reprezintă întreaga conformație, configurație a unui polipeptid, stabilizată prin acțiuni de schimb între lanțurile de suprafață (grupările R) ale aminoacizilor.
d) Structura quaternală reprezintă o asociație de două sau mai multe polipeptide, una sub alta și formarea unei construcții mari. În cazul prealbuminei, întreaga proteină constă din patru subunități identice.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 8. UNELE VARIAȚII CODON – ANTICODON. IPOTEZA WOBBLE

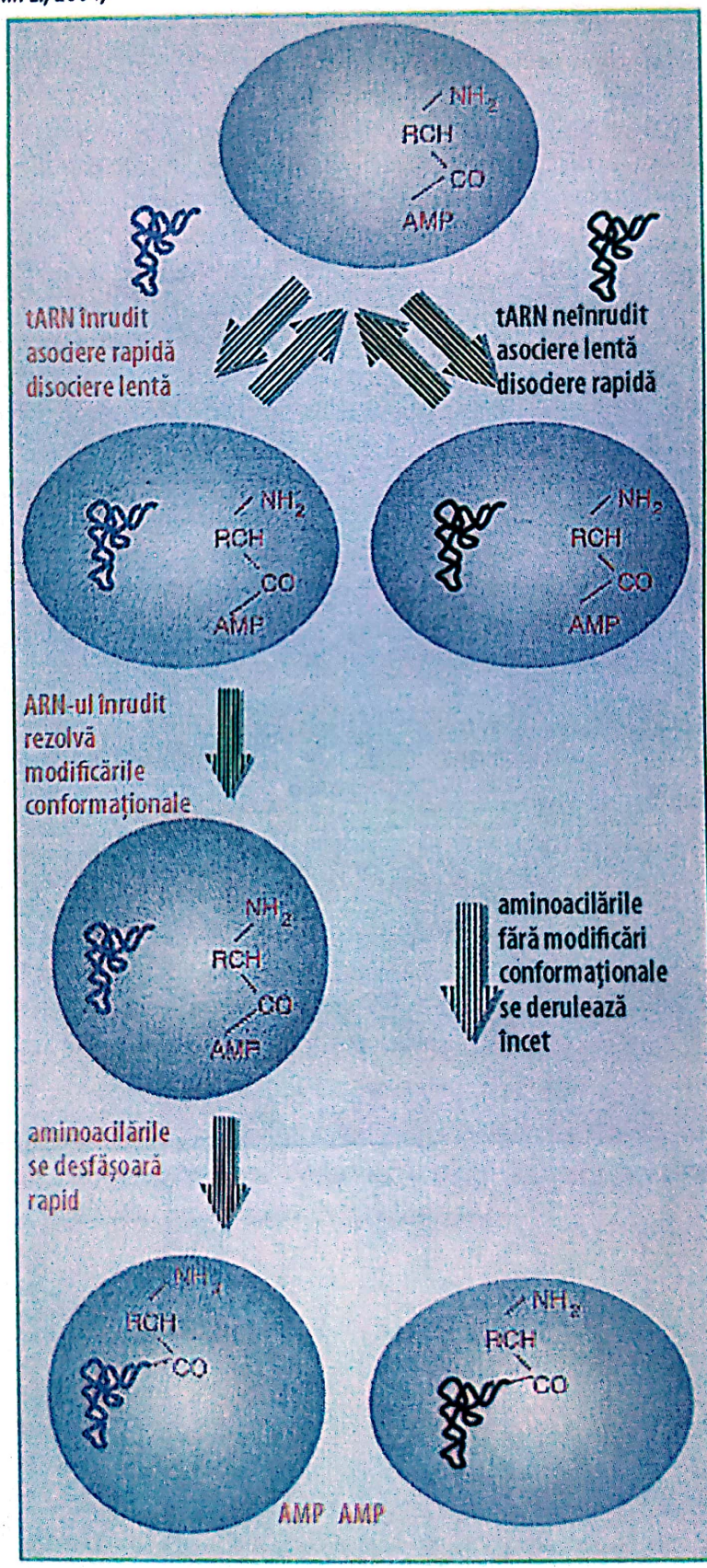
(după Benjamin L., 2004)



Scanned with OKEN Scanner

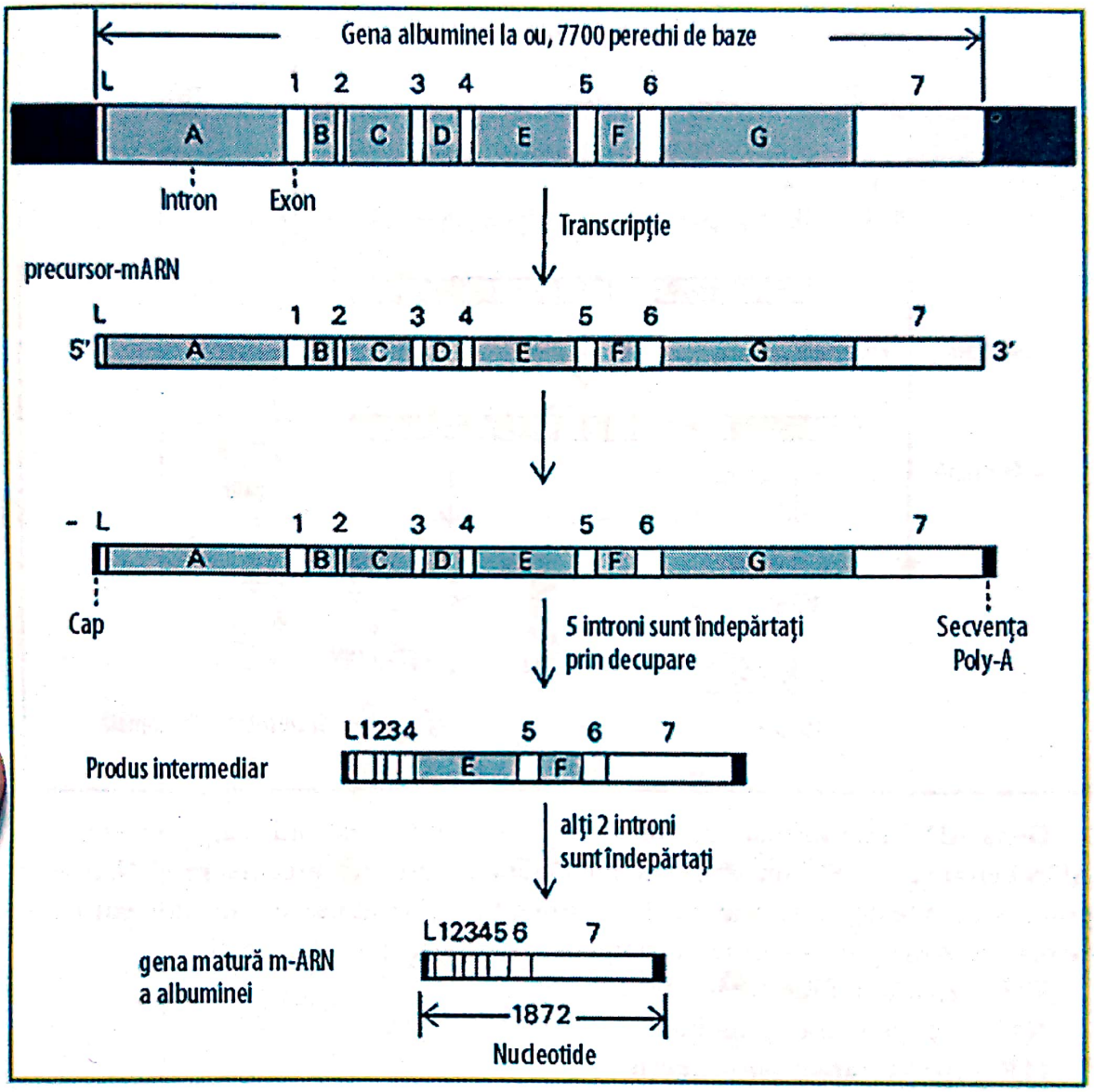
ANEXA 9. RECUNOAŞTEREA tARN-ULUI REAL PRIN CONTROLUL ÎN 3 TRIPLE ALE SINTETAZEI

(după Benjamin L., 2004)



Scanned with OKEN Scanner

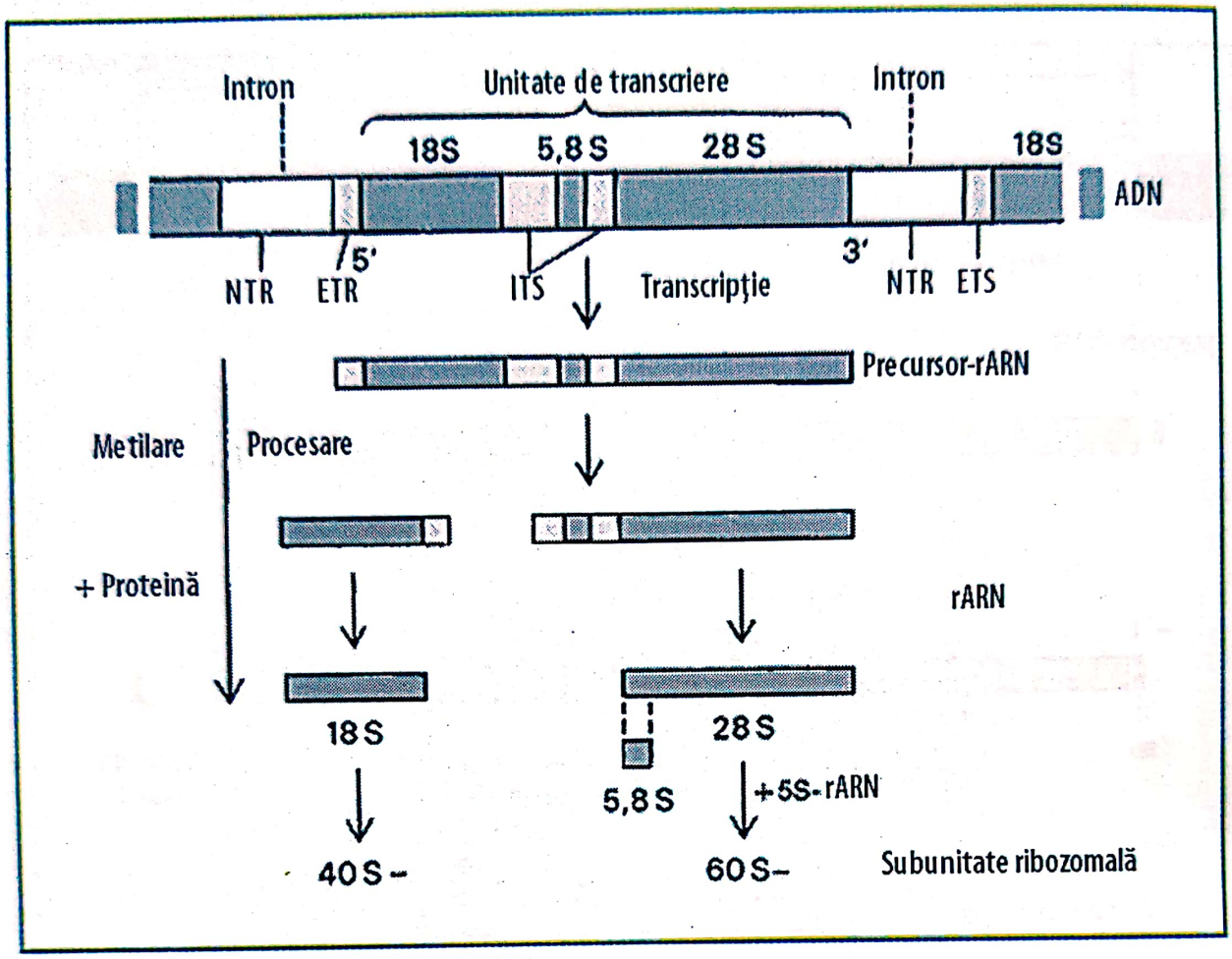
ANEXA 10. SCHEMA UNEI GENE MOZAIC CARE EXPRIMĂ FORMAREA ALBUMINEI LA OU



Prin procesare se formează precursori mARN. Intronii sunt de culoarea gri închis, iar exonii gri deschis. Culoarea neagră este ADN-ul original.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 11. SCHEMA PROCESĂRII DIN ADN A rARN-ULUI



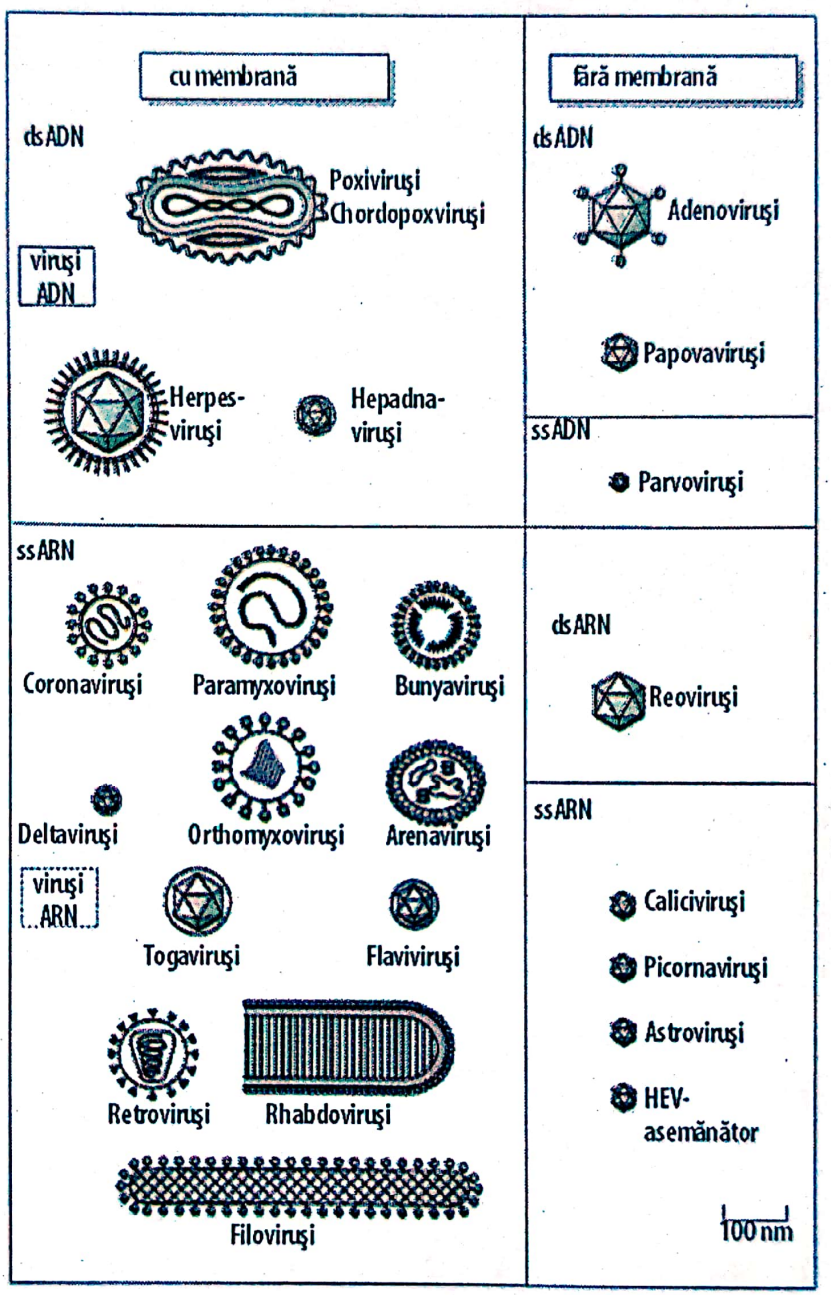
Gena ADN este formată din material transcriptibil (extroni) care alternează cu ADN netranscriptibil – introni. Prin transcripţie se obţine un precursor rARN, ca apoi procesarea să se deruleze prin metilarea proteinelor şi înlăturarea resturilor extronice. Se obţine rARN pur care intră în componenţa materialului ribozomal.

ETR = spaţiu transcriptibil extern
NTR = spaţiu netranscriptibil
ITR = spaţiu transcriptibil intern

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 12. CELE MAI IMPORTANTE TIPURI DE VIRUŞI CARE APAR LA VERTEBRATE

(după Doerfler W., 2002)

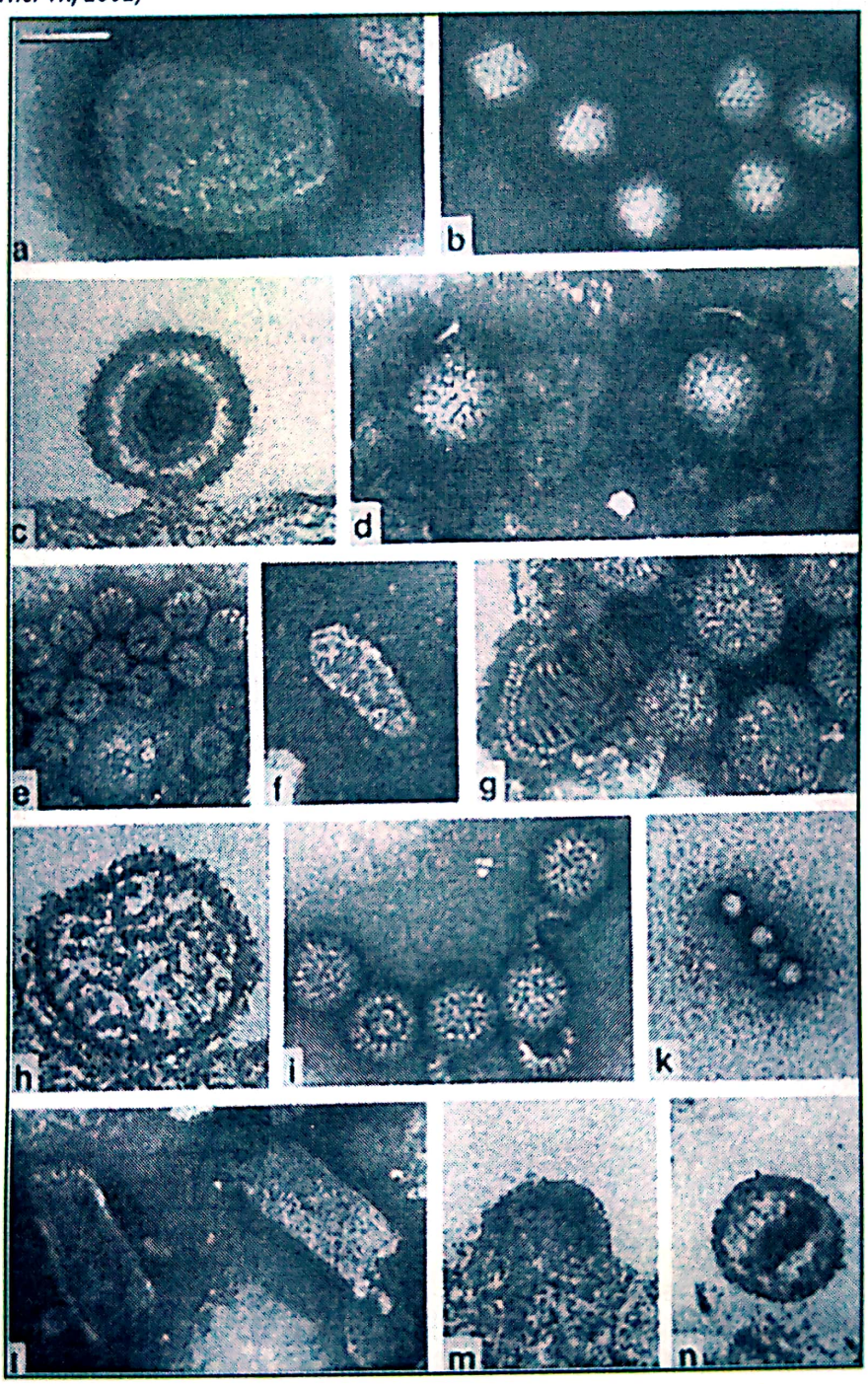


ds.ADN = viruşi dublă coloană ADN
ss.ADN = viruşi cu simplă coloană ADN
ss.ARN = virus cu simplă coloană ARN
ds.ARN = virus cu dublă coloană ARN
n.m = nanometri = $1/10^4$ milimetri = 0,0001 milimetri

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 13. VIRUȘI FOTOGRAFIAȚI LA MICROSCOP ELECTRONIC

(după Doerfler W., 2002)



a) Virusul contagios la moluște
b) Adenovirus – contrast negativ
c) Virusul Herpes-Simplex
d) Virusul Herpes-Simplex, contrast negativ
e) Virus vericulozic la oameni – contrast negativ
f) Virus Corona – contrast negativ
g) Virus Influenza A_2 – contrast negativ
h) Virus Oreion – oameni
i) Virus Rota – oameni
k) Virusul hepatitei A – contrast negativ
l) Virusul rabiei, turbării – contrast negativ
m) Virusul HIV Tip 1

Fotografiile au fost mărite de 135.000 de ori = 13.5^4

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 14. UTILIZAREA COMERCIALĂ A UNOR AMINOACIZI ŞI ENZIME

a) Aminoacizii şi utilizarea lor

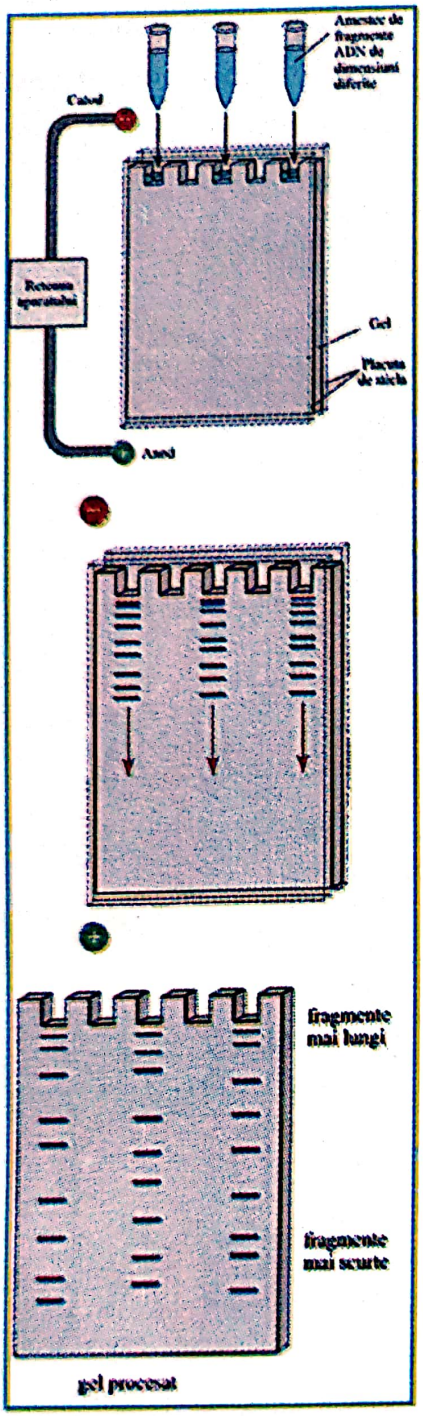
Nr. crt.	Aminoacidul	Domeniul de utilizare
1	Alanină	Pentru îmbunătăţirea gustului
2	Arginină	În tratamentul îmbolnăvirilor de ficat
3	Acid asparinic	Îmbunătăţirea gustului, sinteza îndulcitorilor
4	Asparagină	În diverse terapii
5	Cisteină	Fabricarea pâinii, tratamentul bronşitelor, antioxidant
6	Acid glutaminic	Îmbunătăţeşte şi corectează gustul alimentelor
7	Colicină	În sinteza îndulcitorilor
8	Nistidină	În tratarea ulcerelor tractului intestinal
9	Isolencină	Perfuzii
10	Lencină	Perfuzii
11	Lizină	Adaos în alimentaţia oamenilor şi a animalelor
12	Methionină	Adaos furajer la animale
13	Fenilalanină	Perfuzii, sinteză îndulcitori
14	Prolină	Perfuzii
15	Serină	În cosmetică
16	Treonin	Adaos în furajele animalelor
17	Triptofan	Perfuzii, antioxidant
18	Tirosin	Perfuzii, precursor pentru L-DORA
19	Valin	Perfuzii

b) Principalele enzime comerciale şi utilizarea lor

Enzimă	Domeniul de utilizare
L.amilază	Fabricarea berii, producţia de alcool
Aminoacilază	Fabricarea aminoacizilor tip L
Bromelain	Industria cărnii, industria de sucuri (limpezire)
Celulază	Fabricarea alcoolului şi a glucozei
Ficin	Prelucrarea cărnii, limpezirea sucurilor
Glucozisomciază	Fabricarea siropurilor cu concentrat ridicat în fruct
Glucozoxidază	Antioxidant în industria conservelor
Invertază	Hidroliza zahărului din fructe (inversie)
Cheag	Fabricarea brânzei
Catalază	Antioxidant în industria conservelor
Lactază	Industria laptelui, hidroliza lactozei
Lipoză	Fabricarea brânzeturilor, sinteza corectorilor de gust
Papain	Industria cărnii şi a sucurilor naturale
Pectinază	Industria de sucuri, fabricarea alcoolului
Protează	Industria de detergenţi, producţia de alcool
Glucoamilază	Industria berii şi a alcoolului

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 15. GELELECTROFOREZĂ PENTRU MACROMOLECULE



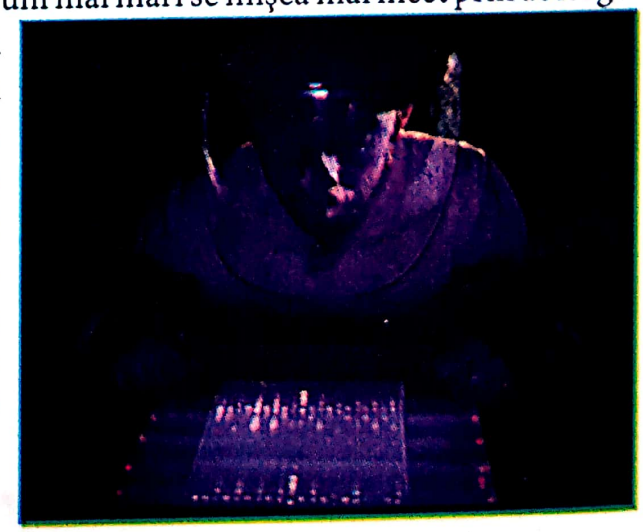
a) Electroforeză în gel a ADN-ului

Gelelectroforeza separă moleculele pe bază vitezei de migrare a acestora în interiorul unui gel şi sub influenţa unui câmp electric. După cum este prezentat în desen (a), se introduce un amestec format din acizi nucleici sau proteine în locaşurile din capătul unei plăci cu gel.

Gelul este susţinut pe nişte plăcuţe din sticle şi este încorporat într-o soluţie apoasă sub formă de tampon. Ambele capete sunt prevăzute cu electrozi şi sursă de tensiune. Fiecare macromoleculă migrează de la catod spre anod, şi anume cu o viteză ce este determinată în primul rând de sarcina şi de mărimea acesteia.

În mod normal, diferite probe apar sub formă de minibenzi pe gelul de pe placă. În cazul acizilor nucleici, drumul parcurs de molecule după cuplarea la sursa de curent este invers proporţională cu viteză de deplasare şi cu lungimea fragmentelor de acizi nucleici. Acizii nucleici sunt purtători de încărcătură negativă cu atât mai mare (grupele de fosfaţi), cu cât este mai lung fragmentul; cu toate acestea gelul are acţiune de „sită de molecule" împiedicând migrarea fragmentelor mai lungi, mai mult decât pe cele scurte.

Gelul din figura b) a fost colorat după electroforeză cu un colorant-liant al ADN-ului, care, în contact cu razele UV se colorează în culoarea roz fluorescent (bromura etidian). Pe fiecare traseu poate fi observată o serie de benzi fluorescente de culoare roz, care corespund fragmentelor de ADN de lungimi diferite. Moleculele de dimensiuni mai mari se mişcă mai încet prin acest gel şi se aşază în partea de sus (aşa cum sunt prezentate în figură). Benzile conţin fragmente de restricţie. Au fost efectuate 20 de probe, fiecare cu un amestec de fragmente, care a fost obţinută prin degradare cu o enzimă de restricţie. Procese de electroforeză în gel se efectuează frecvent în agar sau poliacrilamid.



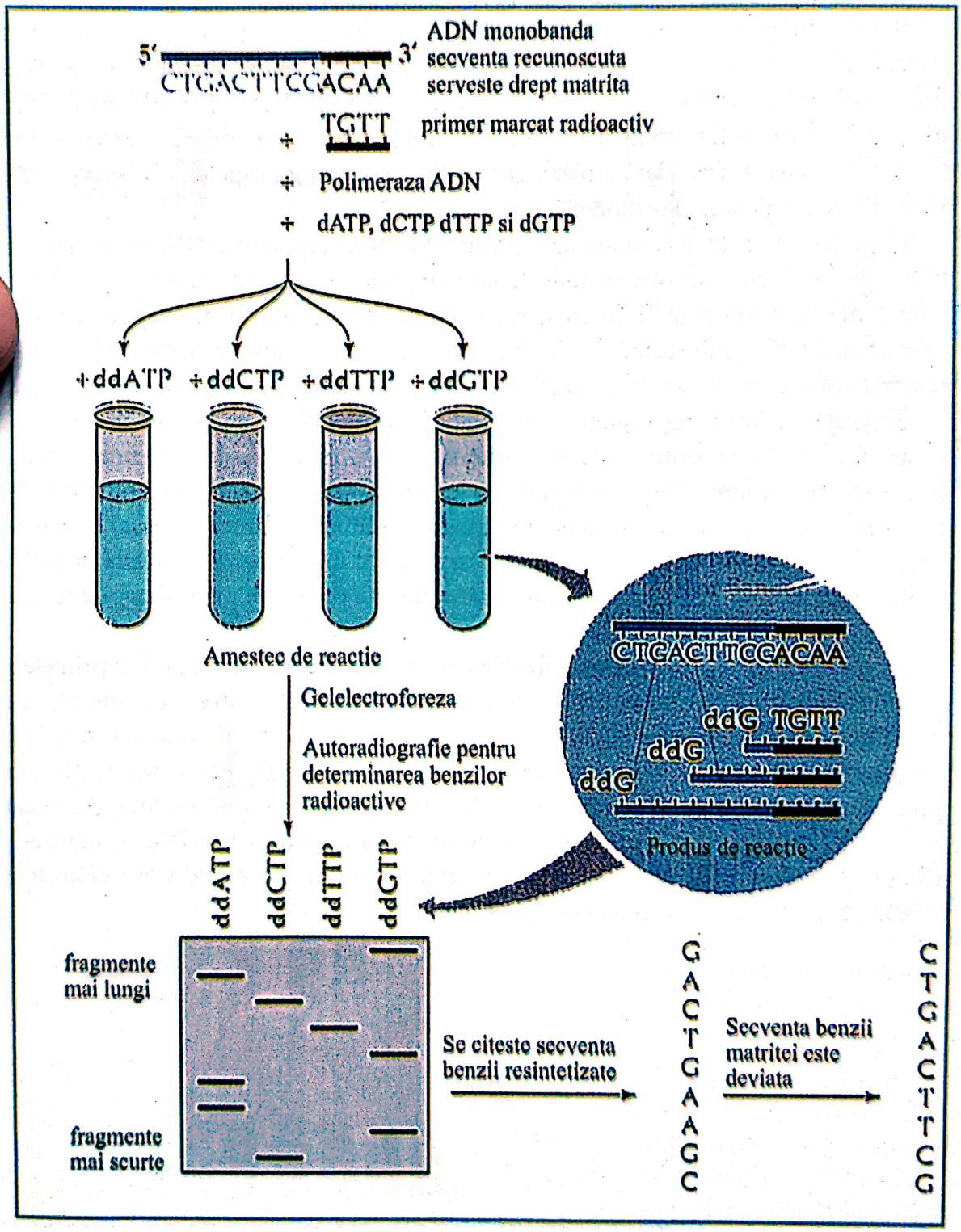
b)

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 16. SECȚIONAREA ADN-ULUI DUPĂ METODA SANGER

Este o metodă descoperită de savantul britanic Frederick Sanger şi se bazează pe determinarea secvenţei nucleotide a unei molecule de ADN obţinută printr-un proces de sinteză „in vitro" a unei benzi complementare faţă de una din cele două benzi individuale ale ADN-ului ce se doresc a fi secvenţionate.

Metoda se bazează pe inducerea la întâmplare a unor nucleotide modificate (bidesoxyribonucleotizi, cărora le lipsesc doi atomi de oxigen), cu ajutorul cărora se



Scanned with OKEN Scanner

realizează o sinteză suplimentară de ADN. Pe un primer pot fi sintetizate o serie de fragmente de ADN, care încetează abia în momentul inducerii unui didezoxyribonucleotid. Întrucât, din motive statistice, acest lucru poate avea loc în orice poziție dorită a moleculei de ADN, se produce un șir întreg de fragmente, care sunt lipsite de un nucleotid (scurtate de un nucleotid); amestecul reprezintă în totalitate ADN-ul ce urmează a fi supus procesului de secvențiere. În câmpul prealabil al analizei de secvențiere, ADN-ul se descompune în fragmente de restricționare; acestea se separă la rândul lor și sunt supuse, individual, procedurii prezentate.

În prezent, procesul de secvențiere a ADN-ului este în totalitate automatizat. Ca alterntivă pentru marcarea fragmentelor cu primeri radioactivi, aparatele de secvențiere de ultimă generație, utilizează substanțe fluorescente, legate de nucleotizii ADN-ului; în felul acesta fiecare nucleotid este colorat într-o culoare diferită, astfel putând fi posibilă desfășurarea clară a patru reacții în același timp; capetele-didezoxy pot fi identificate prin codul de culoare.

O preparație a unei monobenzi aparținând unui fragment ADN, se împarte în patru probe. Fiecare probă include toate componentele pentru sinteza unei benzi complementare: un primer (marcat radioactiv), polimerază ADN și cei patru dezoxiribonucleotizi (sub formă de d). Suplimentar, fiecare dintre amestecurile acestei reacții conțin unul din cei patru nucleotizi în formă didezoxy (formă dd) modificată.

Sinteza benzilor complementare începe de la primer și continuă atâta vreme până ce are loc inducerea unui nucleotid didezoxyribo, ceea ce conduce la întreruperea procesului de sinteză. Întrucât amestecul de reacție conține atât nucleotizi dezoxy cât și didezoxyribo, cei doi nucleotizi se găsesc la inducerea (introducerea) benzii de ADN în concurență. Ca urmare, rezultă un amestec de segmente de ADN, marcate radioactiv, de lungimi diferite. În figura alăturată este prezentat un amestec de reacție cu dd GTP.

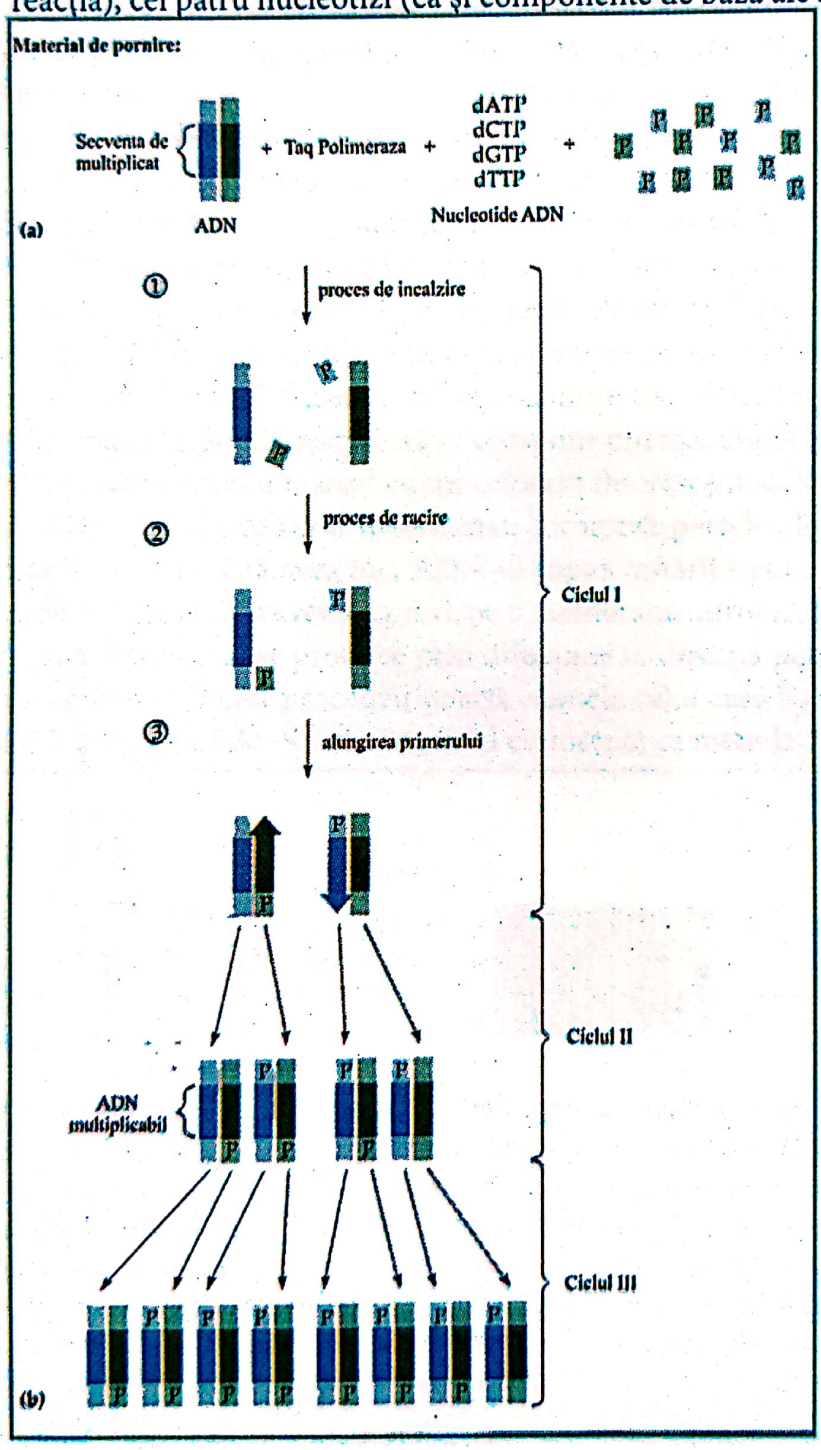
Noile benzi de ADN, provenite din fiecare amestec de reacție, se separă prin electroforeză într-un gel poliacrilamidic, cu concentrație ridicată, extrem de subțire, care poate separa moleculele de ADN, care se deosebesc din punctul de vedere al lungimii acestora doar printr-un singur nucleotid. Secvența benzii de ADN nou sintetizate poate fi citită direct de pe banda de gel. În exemplul nostru, cel mai lung fragment se termină cu ddG, prin urmare G este ultima bază în banda de ADN resintetizată. Cel de-al doilea fragment asemănător în lungime se termină cu ddA, astfel încât A rămâne penultima bază a benzii de ADN, și așa mai departe.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 17. REACȚIA ÎN LANȚ A POLIMERAZEI (PCR – POLIMERASE CHAIN REACTION)

Reacția în lanț a polimerazei (PCR) constituie o metodă de obținere a mai multor copii ale unui anumit fragment de ADN. Aceasta este o metodă mai rapidă decât clonarea cu ajutorul unei plasmide sau a unui fag, realizându-se numai „in vitro".

Materialul utilizat pentru această reacție (a) constă din benzi duble de AND, care conțin secvența dorită de multiplicare a ADN-ului (aceasta poate fi, fie o genă, fie o secvență necodificată). Cercetătorii adaugă apoi polimeraza ADN (care catalizează reacția), cei patru nucleotizi (ca și componente de bază ale noului ADN ce urmează a fi sintetizat) și primerul.



Primerii vor fi apoi utilizați de către polimerază la pornirea sintezei ADN-ului. Primerii speciali, utilizați la reacția în lanț a polimerazei, vor fi sintetizați chimic și sunt complementari capetelor secvenței de ADN ce urmează a fi multiplicată. La punctul (b) se prezintă acest proces de evoluție a reacției în lanț a polimerazei.

(1) ADN-ul se încălzește ușor pentru a face posibilă separarea celor două benzi și apoi se răcește.

(2) astfel încât primerii să poată fi legați prin legături de hidrogen, de secvențele lor – țintă, la capetele ADN–ului ce urmează a fi multiplicat și anume fiecare polimer primer de câte o bandă.

În continuare, polimeraza ADN ajută la alungirea (extinderea) primerilor, prin adăuga-

Scanned with OKEN Scanner

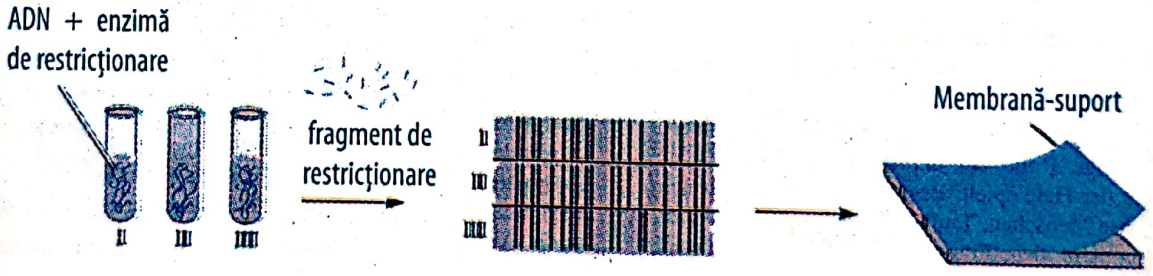
rea de nucleotizi, astfel încât banda mai lungă este folosită ca bază de pornire. În scurt timp, cantitatea de ADN s-a multiplicat. Proba se reîncălzeşte şi se începe un nou ciclu cu separarea benzilor, cuplarea cu primerul şi sinteza de ADN. Acest ciclu care durează cca 5 minute este complet automatizat şi are loc într-un „cycler", se repetă de atâtea ori până se formează o cantitate suficientă de ADN. Există totuşi o limitare faţă de numărul de reprize de replicare, întrucât în timpul procesului de replicare sunt înregistrate, doar în cazuri excepţionale, greşeli (in vitro – producerea mutaţiilor). O premiză pentru evoluţia reacţiei în lanţ a polimerazei a fost descoperirea polimerazei termostabile pentru amplificare, reacţie prin care, amestecul de reacţie poate fi încălzit la 80°C, şi chiar peste această temperatură, fără a denatura enzima. Se utilizează procesul de polimerază I extrasă *Thermus aquaticus* (Polimerază Taq), o bacterie ce trăieşte în izvoare termale fierbinţi.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 18. HIBRIDIZAREA ACIZILOR NUCLEICI ŞI ABSORBŢIA PRIN METODA SOUTHERN-BLOTTING

Tehnica de hibridizare a acizilor nucleici este o metodă generală pentru determinarea şi analizarea secvenţelor de ADN asemănătoare (analoage). Prin acest procedeu, se poate demonstra dacă în cadrul unor probe diferite de ADN (de ex. provenite din organisme diferite) apar secvenţe identice (omologe). Tot prin acest procedeu se poate determina şi numărul acestor secvenţe identice dintr-un genom şi de asemenea cunoaşterea mărimii fragmentelor restrictive, pe care sunt localizate aceste segmente. Astfel, pot fi stabilite diferenţele genetice dintre organisme.

După cum reiese din prezentarea schematică următoare, în cazul procesului de hibridizare sunt folosite cinci tehnici diferite şi despre unele dintre ele am vorbit deja: digestia ADN-ului cu enzime restrictive, transferul Blot al ADN-ului pe un material-suport, utilizarea de sonde ADN şi autoradiografii. Materialul de bază utilizat în procesul de hibridizare al acizilor nucleici este format, în cele mai multe cazuri, din întregul genom al organismului. Din aceste molecule mari de ADN, se formează atât de multe fragmente restrictive, încât, după colorarea gelului din electroforeză, nu pot fi obţinute benzi de ADN discrete, ci doar o colorare neuniformă şi confuză. În cele din urmă, benzile de ADN decisive sunt vizibile în mod selectiv dacă se utilizează o sondă ADN marcată. Sonda respectivă se compune din mai multe copii ale unui fragment de ADN radioactiv, sau marcat cu un colorant fluorescent, care, împreună cu segmentul de ADN ce urmează a fi determinat, formează perechi de baze. Pentru ca această hibridizare să poată avea loc, ADN-ul supus testării trebuie transferat pe un suport stabil, în cele mai frecvente cazuri, pe o membrană nitrocelulotică sau o membrană de naylon. Transferul se produce prin difuziune în direcţia puterii de absorbţie capilară a membranei. Acest procedeu poartă numele celui care l-a descoperit şi publicat în 1975, şi anume E.M. Southern , fiind cunoscută ca metoda Southern-Blotting.

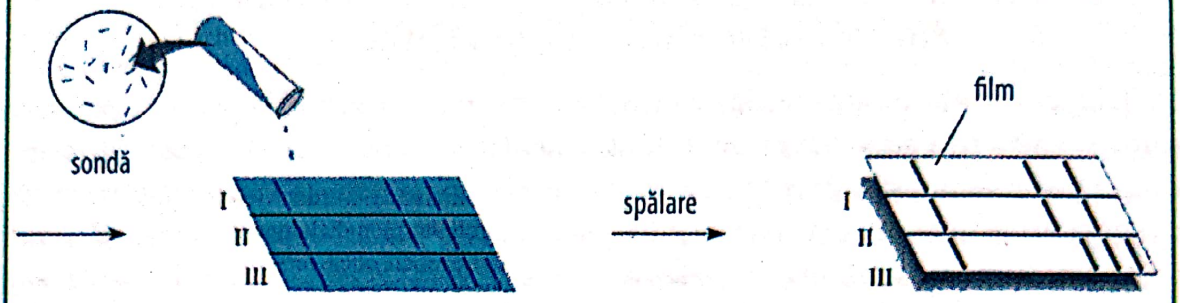


(1) Producerea fragmentelor de restricţionare. ADN-urile ce urmează a fi supuse testării (în cazul de faţă, denumite proba I, II şi III), vor fi izolate din sursele respective. Pentru secţionarea ADN-urilor în fragmente, celor trei probe li se adaugă o enzimă de restricţie.

(2) Electroforeză. Amestecul format din fragmente restrictive provenit din fiecare probă, se separă cu ajutorul gelelectroforezei. Fiecare probă formează o bandă-mostră caracteristică (de regulă, benzile sunt infinit mai multe decât cele prezentate aici).

(3) Blotting. După denaturarea ADN-ului în gel, monobenzile sunt transferate cu ajutorul unor forţe capilare pe o membrană nitrocelulozică sau membrană din nailon. Acest procedeu este denumit Southern-Blotting.

Scanned with OKEN Scanner



(4) Sondă radioactivă. O sondă marcată, radioactivă, se adaugă benzilor de ADN. Sonda se compune din benzi individuale de ADN, complementare la gena ce urmează a fi determinată. Sonda face legătura prin perechile sale bazice cu fragmentul de restricționare, cu care este complementară.

(5) Autoradiografie. După ce sonda a fost hibridizată, ADN-ul care nu a fost legat, urmează a fi spălat. Pe gel se așază un film cu raze Röntgen. Radioactivitatea sondei de ADN conduce la înnegrirea filmului în poziția acelor benzi de ADN la care este legată sonda.

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 19. TEHNICA MUTAGENEZĂ *IN VITRO*

Cercetătorii utilizează această metodă pentru inducerea dirijată de mutaţii în anumite gene. Pentru realizarea acestui lucru, se introduce în primul rând, o alelă de tip sălbatic (de culoare albastru-deschis,, pe desen), într-o plasmidă sau într-un alt vector corespunzător şi se clonează hibridul ADN*.

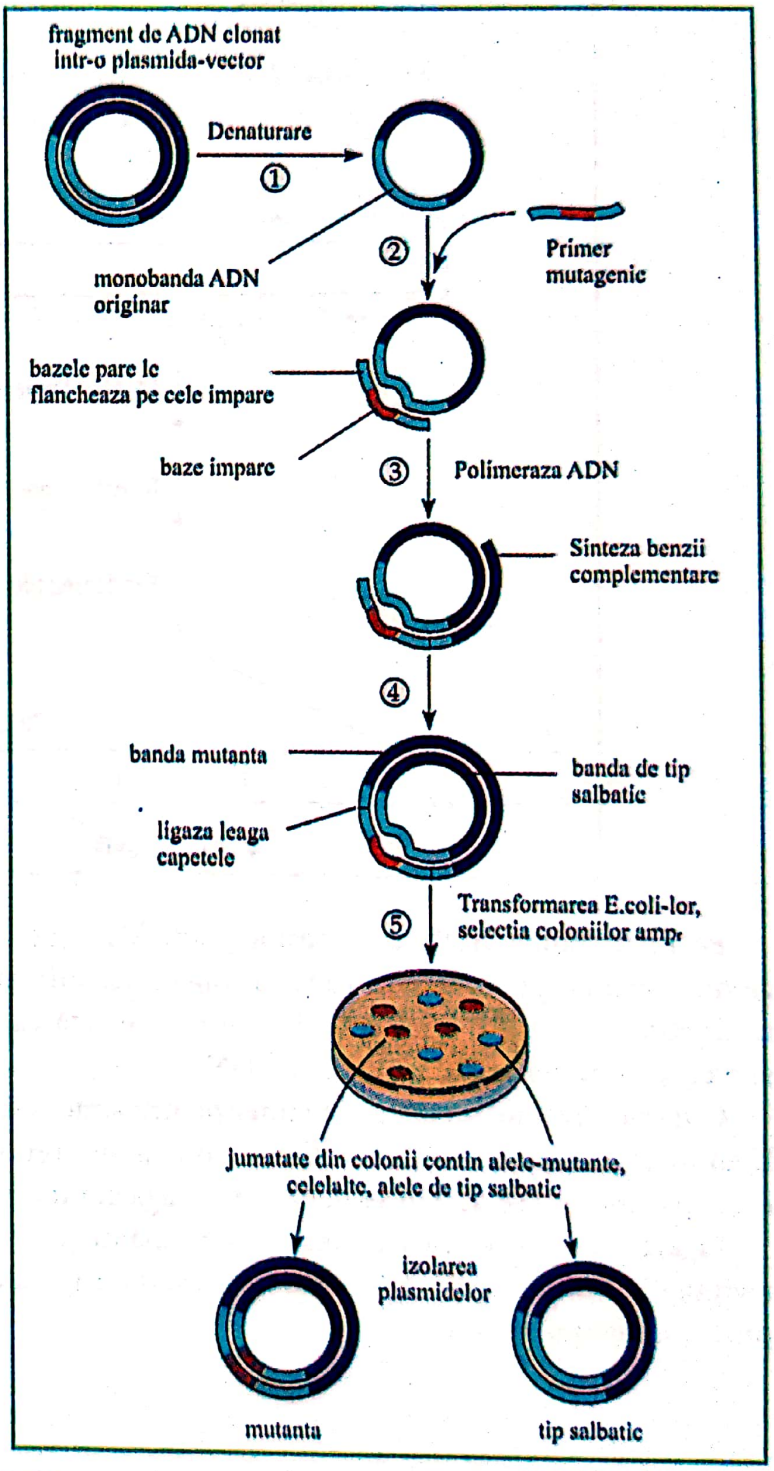
(1) După clonare, plasmidul dublu-bandă este denaturat pentru a se obţine ADN-ul originar în formă monobandă, aceasta conţinând versiunea sălbatică a alelei.

(2) Un primer ce conţine mutaţii genetice se hibridizează cu matricea monobandă obţinută la punctual (1). Primerul este compus din două secvenţe complementare ale ADN-ului originar. Acestea flanchează o regiune cu baze false (mismatch).

(3) Prin adăugare de ADN-polimerază, se prelungeşte primerul şi este produsă o plasmidă cu dublu-benzi, din care o bandă conţine informaţia genetică iniţială, în timp ce cealaltă bandă preia informaţia alelei-mutante.

(4) Cu ajutorul acestui plasmide-vector, se realizează transformarea celulei bacteriene care reproduce ambele benzi ale plasmidei. Dacă o celulă se divide, una din celulele-fiice va primi versiunea alelei-mutante, iar cealaltă, pe cea de tip sălbatic (originar).

(5) Ca urmare, jumătate din colonii constituie materialul de pornire pentru obţinerea alelelor-mutante şi a genelor care le induc. Proteina defectă, rezultată, face posibilă, prin comparaţie cu proteina de tip sălbatic, o privire asupra funcţiilor genei sau ale proteinei (coloniile reale-mutante nu sunt marcate color.

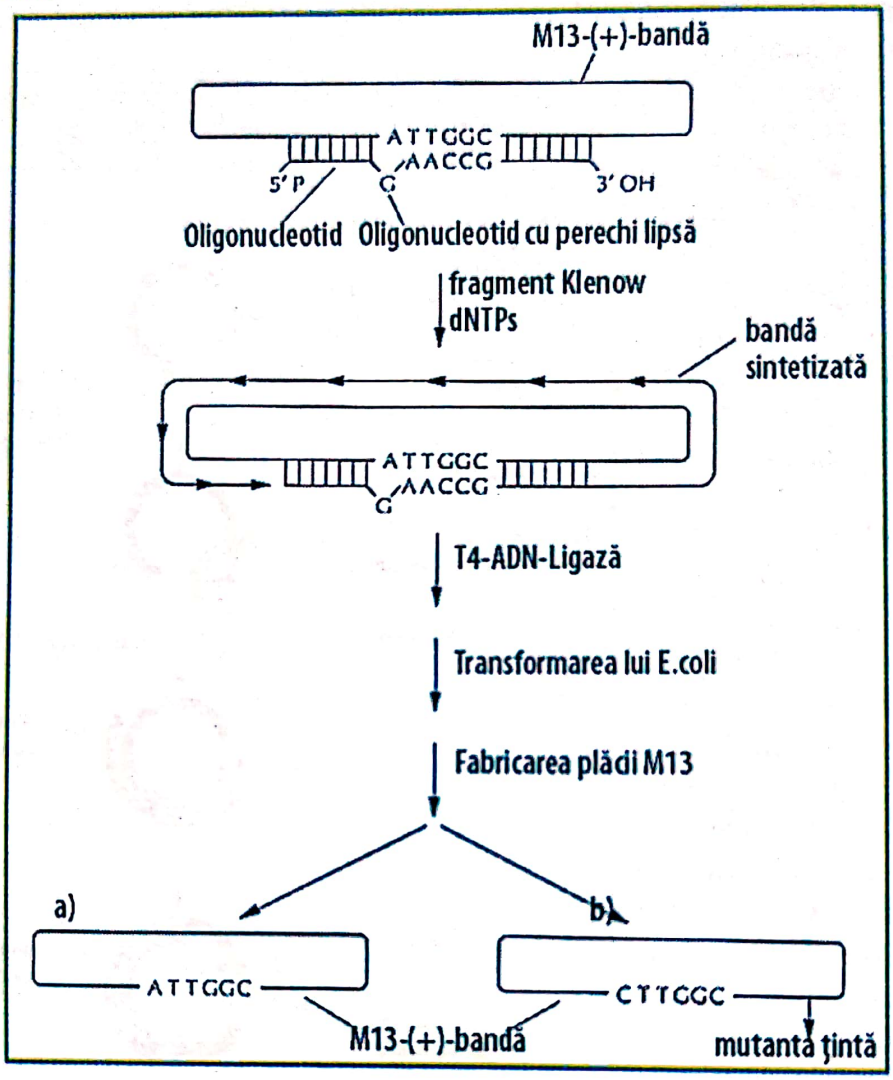


* Prin alelă sălbatică se poate înţelege mai ales o genă de interes, dar care este străină de ADN-ul plasmidei vector

Scanned with OKEN Scanner

ANEXA 20. MUTAGENEZĂ COORDONATĂ DE OLIGONUCLEOTIDE CU AJUTORUL ADN-ULUI M13

(Lodish şi colab.)



Pe monobanda ADN a bacteriofagului M13 [(+)=bandă] care conţine o genă clonată se adaugă, se depozitează un oligonucleotid sintetic complementar. Oligonucleotidul conţine o bază complementară defectă care nu se poate împerechea cu secvenţa sa partener din gena ţintă ADN.

Oligonucleotidul serveşte ca **primer** pentru sinteza ADN împreună cu un fragment Klenow al polimerazei ADN-1. Gena clonată, împreună cu vectorul M13, formează matricea. Sinteza se declanşează până întreaga bandă este copiată.

Ligaza T4-ADN circularizează (transformă în cerc) banda nou sintetizată. Ceea ce rezultă din aceste reacţii reprezintă fie varianta originală a ADN-ului (a), fie mutanta ţintă a secvenţei de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Pomul din imagine se afla undeva în județul Prahova. Era un pom special, sălbatic, dintre cei care mai populează zonele de dealuri, găsindu-se adesea pe hotarele ce delimitează parcelele mici de păşuni şi fânețe ale gospodarilor. Mărul din imagine nu a fost niciodată bolnav, nici de Venturia, nici de făinare şi nici măcar de mucegai. Am încercat în zadar să-l îmbolnăvesc, folosind surse de infecție din plantația alăturată. În vara anului 2000, m-am hotărât să aflu de ce nu se îmbolnăveşte. Am luat câteva frunze, lăstari şi fructe, foarte puține ca să nu am probleme cu vama, şi am poposit într-un laborator occidental bine echipat pentru scanarea genomică. Am descoperit că în unele gene ale pomului existau secvențe nucleotide care induceau inhibitori ai celor trei boli.

Pomul avea o valoare deosebită, dacă foarte proaspătul lui proprietar nu l-ar fi tăiat în iarna următoare, pentru a-l transforma în lemne de foc. Astfel, eu am pierdut o valoroasă sursă de studiu, iar omul nostru, în locul a peste 1,5 milioane euro, cât ar fi putut primi pentru pomul lui, s-a ales cu câteva brațe de vreascuri.
Atunci, m-am hotărât să scriu această carte.

Mihai Berca

ISBN 973-40-0710-6

Scanned with OKEN Scanner